

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
20. Juni 2002 (20.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/48321 A2**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 9/00, 5/10,  
C07K 16/40, C07D 209/96

(74) Gemeinsamer Vertreter: BAYER AKTIENGE-  
SELLSCHAFT; 51368 Leverkusen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/14108

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(22) Internationales Anmeldedatum:  
3. Dezember 2001 (03.12.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:  
100 62 422.7 14. Dezember 2000 (14.12.2000) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): BAYER AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]; 51368 Leverkusen (DE).

(72) Erfinder; und

Veröffentlicht:

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): FISCHER, Reiner [DE/DE]; Nelly-Sachs-Str. 23, 40789 Monheim (DE). FRANKEN, Eva-Maria [DE/DE]; Sternstr. 21, 42799 Leichlingen (DE). NAUEN, Ralf [DE/DE]; Dechant-Miebach-Weg 43, 40764 Langenfeld (DE). TEUSCHEL, Ute [DE/DE]; Im Frohental 10, 51371 Leverkusen (DE).

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: USE OF ACETYL-COA CARBOXYLASE FOR IDENTIFYING COMPOUNDS THAT HAVE AN INSECTICIDAL EFFECT

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON ACETYL-COA CARBOXYLASE ZUM IDENTIFIZIEREN VON INSEKTIZID WIRKSAMEN VERBINDUNGEN

(57) Abstract: The invention relates to nucleic acids, which code for polypeptides from insects having the biological activity of acetyl-CoA carboxylases, to polypeptides coded thereby, and to their use for identifying novel compounds that have an insecticidal effect. The invention also relates to methods for discovering modulators of these polypeptides, and to the use of these compounds as inhibitors of the ACCase from insects.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für Polypeptide aus Insekten mit der biologischen Aktivität von Acetyl-CoA Carboxylasen kodieren, die davon kodierten Polypeptide und deren Verwendung zum Identifizieren von neuen, insektizid wirksamen Verbindungen. Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zum Auffinden von Modulatoren dieser Polypeptide sowie die Verwendung dieser Verbindungen als Inhibitoren der ACCase aus Insekten.

WO 02/48321 A2

**Verwendung von Acetyl-CoA Carboxylase zum Identifizieren von insektizid wirksamen Verbindungen**

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Polypeptiden und Enzympräparationen mit der biologischen Aktivität einer Acetyl-CoA Carboxylase zum Identifizieren von neuen, insektizid wirksamen Verbindungen, sowie Verfahren zum Auffinden von Modulatoren dieser Polypeptide.

Die Acetyl-CoA Carboxylase (EC 6.4.1.2), im Folgenden als ACCase bezeichnet, katalysiert die Biotin-abhängige Carboxylierung von Acetyl-CoA und stellt den Schrittmacher der de novo Fettsäurebiosynthese dar. Die ACCase besitzt drei Domänen: Biotin-Carboxyl-Carrier (BCC), Biotin-Carboxylase (BCase) und Carboxyltransferase (CTase). Die durch die ACCase katalysierte Reaktion kann in zwei Schritte unterteilt werden. In einem ersten Schritt wird unter ATP-Spaltung durch die BCase-Aktivität eine CO<sub>2</sub>-Gruppe aus Bicarbonat auf ein kovalent an den BCC gebundenes Biotin übertragen. Im nächsten Schritt wird die so aktivierte Carboxylgruppe durch die CTase auf Acetyl-CoA übertragen und damit Malonyl-CoA gebildet (Knowles JR, 1989). Es gibt zwei physiologisch verschiedene ACCase Formen. Bei der heteromeren Form, die in Bakterien und den Chloroplasten von Pflanzen vorkommt, werden die drei Domänen durch drei separate, dissoziierbare Proteine gebildet. Die homomere ACCase besteht aus einer Polypeptidkette, welche alle drei Domänen enthält und im Cytosol von Pflanzen, Tieren und Pilzen zu finden ist (Ke J et al., 2000). Bei Pflanzen und Vertebraten wird die ACCase durch zahlreiche Mechanismen, z.B. allosterisch durch Citrat, Palmitoyl-CoA, durch Phosphorylierung / Dephosphorylierung, durch Proteinkinasen sowie auf der Ebene der Genexpression reguliert (Munday MR & Hemingway CJ 1999; Ke J et al. 2000). Über die Regulation des Enzyms aus Insekten liegen keine Informationen vor.

Zahlreiche Gene von ACCasen aus Pflanzen, Pilzen und Vertebraten wurden bereits kloniert (z.B. Abu-Elheiga L et al. 1994; Bailey A et al. 1995; Goffeau A et al. 1996; ACCase aus *Arabidopsis thaliana* Genbank AAF18638546) oder zum Patent

angemeldet (z.B. Haselkorn R & Gornicki P 1999; Somers DA 1999; Jenkins AR et al. 1992). Eine annotierte, also der ACCase zugeordnete Sequenz aus Insekten liegt jedoch noch nicht vor.

5 Aus einer großen Zahl biochemischen Arbeiten an Pflanzen und Pilzen sind Inhibitoren der ACCase aus Pflanzen und Pilzen als Herbizide bzw. Fungizide bekannt (Vahlensieck HF et al. 1994; Gronwald JW 1994). Ein weiteres Dokument beschreibt die als ACCase-Hemmer bekannten Fungizide Soraphen A und B zur  
10 Bekämpfung von Milben, die nicht zur Ordnung der Insekten gehören (Sutter M. et al., 1991).

Die Wirkung von Hemmern der humanen ACCase auf Insekten wurde in einer Veröffentlichung untersucht (Popham, HJR et al. (1996): Effect of a hypolipidemic agent on the growth and development of the southwestern corn borer, *Diatraea*  
15 *grandiosella*. Comp. Biochem. Physiol., C: Pharmacol., Toxicol. Endocrinol. (1996), 115 (3), 247-249), allerdings werden hier in erster Linie physiologische Fragen beleuchtet.

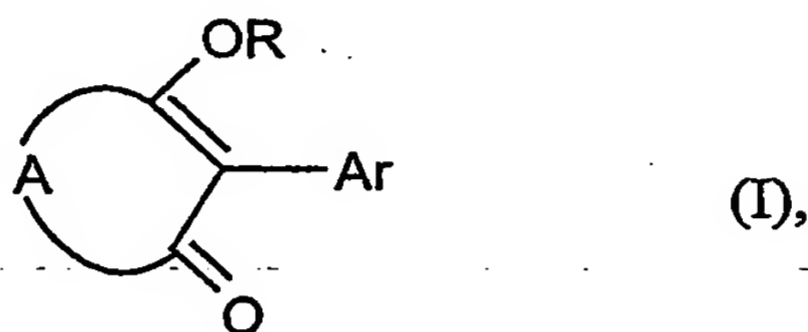
Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es deshalb, die ACCase aus Insekten  
20 verfügbar zu machen, deren Eignung als Wirkort für Insektizide zu prüfen, und Verfahren zur Verfügung zu stellen, um insektizide Wirkstoffe zu identifizieren.

In der vorliegenden Erfindung wurden nun aus verschiedenen Larvenstadien oder Adulten der Pfirsichblattlaus *Myzus persicae* durch Homogenisierung in geeigneten  
25 Puffern Rohextrakte gewonnen. Diese Rohextrakte wurden vorgereinigt und die ACCase Aktivität in einem radioaktiven Enzymtest bestimmt.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte nun erstmalig gezeigt werden, dass Verbindungen existieren, die im Enzymtest die Aktivität der ACCase aus Insekten  
30 z. B. aus *Myzus persicae*, hemmen. Der Befund, dass bestimmte Verbindungen die

ACCCase hemmen, zeigt, dass die ACCase der Interaktionspartner (das Target) dieser Wirkstoffe ist und ein Zielprotein insektizid wirksamer Verbindungen darstellt.

In der vorliegenden Erfindung wird weiter gezeigt, dass insbesondere cyclische 1,3-Dicarbonylverbindungen sowie deren Enole der Formel (I)



worin

Ar für substituiertes Aryl oder Hetaryl mit mindestens einem ortho-Substituenten steht,

R für H oder für Acylreste steht, bevorzugt für die Reste  $\text{COR}^1$  und  $\text{CO}_2\text{R}^1$  worin

15

$\text{R}^1$  für gegebenenfalls substituiertes Alkyl, Phenyl oder Hetaryl steht, und

A mit den verknüpften C-Atomen einen gegebenenfalls substituierten 5- oder 6-gliedrigen Carbo- oder Heterocyclus bildet, wobei als Heteroatome beispielsweise N, O und/oder S in Frage kommen,

20

Inhibitoren der ACCase darstellen. Solche cyclische 1,3-Dicarbonylverbindungen sind aus den folgenden Dokumenten bekannt, die explizit Teil dieser Anmeldung sein sollen:

25

EP-A-355 599, EP-A-377 893, EP-A-415 211, EP-A-442 077, EP-A-442 073, EP-A-497 127, EP-A-501 129, EP-A-615 950, EP-A-521 334, EP-A-596 298, EP-A-613 884, EP-A-613 885, EP-A-706 527, EP-A-643 159, EP-A-741700, EP-A-668 267,

EP-A-754 175, EP-A-792 272, EP-A-809 629, EP-A-825 982, EP-A-835 243, EP-A-837 847, EP-A-891 330, EP-A-912 547, EP-A-915 846, EP-A-918 775, EP-A-944 633, EP-A-1 017 674, EP-A-1 028 963, EP-A-1 056 717, WO-A-99/48869, WO-A-99/55673, EP-A-528 156, EP-A-647 637, EP-A-792 272, EP-A-799 228, EP-A-944 633, EP-A-1 017 674, EP-A-588 137, EP-A-799 228, EP-A-751 942, EP-A-588 137, EP-A-879 232, EP-A-865 438, WO-A-00/15632, WO-A-00/21946, WO-A-00/24729, EP-A-675 882, EP-A-769 001, EP-A-987 246, EP-A-773 920, EP-A-854 852, EP-A-966 420, EP-A-508 126.

10 Damit wird in der vorliegenden Anmeldung gezeigt, dass die genannten cyclischen 1,3-Dicarbonylverbindungen als Inhibitoren der ACCase in Insekten verwendet werden können. Die Verwendung der Verbindungen der Formel (I) als Inhibitoren der ACCase in Insekten ist auch Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

15 In der vorliegenden Erfindung wird weiter gezeigt, dass die Hemmung der ACCase zum Absterben von behandelten Insekten führt. Bislang war nicht bekannt, dass die ACCase in Insekten ein Zielprotein insektizid wirksamer Substanzen ist. Damit wird hier auch zum ersten Mal gezeigt, dass die ACCase ein für Insekten lebenswichtiges Enzym darstellt und deshalb in besonderem Maße dazu geeignet ist, als Zielprotein  
20 für die Suche nach weiteren und möglicherweise verbesserten insektiziden Wirkstoffen verwendet zu werden.

In der vorliegenden Erfindung wird weiterhin zum ersten Mal die ACCase aus *Drosophila melanogaster* anhand ihrer Nukleinsäuresequenz beschrieben und damit  
25 zugänglich gemacht. Die Nukleinsäuresequenz der Accession Number AAF59156 ist bereits seit geraumer Zeit zugänglich. Die Bedeutung der Sequenz bzw. das davon kodierte Polypeptid und dessen biologische Funktion waren jedoch bislang unbekannt, ebenso wie kodierende Region dieses Sequenzabschnitts.

30 Bedeutung, Funktion und die kodierende Region sowie das von dieser Nukleinsäure kodierte Polypeptid werden nun im Rahmen der vorliegenden Erfindung erstmals

zugänglich gemacht. So wird die für die ACCase aus *Drosophila melanogaster* kodierende cDNA gemäß SEQ ID NO:1 und das davon kodierte Polypeptid gemäß SEQ ID NO: 2 in der vorliegenden Anmeldung angegeben sowie deren Verwendung zum Identifizieren von insektizid und gegebenenfalls auch akarizid wirksamen Substanzen beschrieben. Die Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO:1 und das davon kodierte Polypeptid gemäß SEQ ID NO:2 sind ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

Da die ACCasen, im Besonderen auch die hier vorliegende ACCase aus *Myzus persicae* sowie *Drosophila melanogaster* und anderen Insekten beträchtliche Homolgien zueinander aufweisen, können auch homologe Polypeptide, die von entsprechenden homologen Nukleinsäuren kodiert werden, sowie weitere Mitglieder der Genfamilie als molekulare Interaktionspartner (Targets) insektizider Wirkstoffe, insbesondere der Verbindungen der Formel (I), verwendet werden. Besonders bevorzugt handelt es sich bei den homologen Polypeptiden um solche, die zur ACCase aus *Myzus persicae* oder *Drosophila melanogaster* eine Identität von 60%, bevorzugt 80%, besonders bevorzugt 90% und besonders bevorzugt 95% über eine Länge von wenigstens 20, vorzugsweise wenigstens 25, besonders bevorzugt wenigstens 30 fortlaufenden Aminosäuren und ganz besonders bevorzugt über die Gesamtlänge aufweisen.

Insektizide und/oder akarizide Wirkstoffe, die gegebenenfalls mit Hilfe der erfindungsgemäßen ACCasen gefunden werden können, können demnach auch mit ACCasen aus zahlreichen anderen Akarina- oder Insektenspezies interagieren, wobei die Interaktion mit den unterschiedlichen in den Insekten oder Akarina vorkommenden ACCasen nicht immer gleich stark sein muss. Dies erklärt unter anderem die beobachtete Selektivität der an diesem Enzym wirksamen Substanzen. Besonders bevorzugte ACCasen bzw. Herkunftsorganismen sind beispielhaft und nicht abschließend in der nachfolgenden Tabelle 1 aufgeführt:

	Bevorzugte Herkunftsorganismen der erfindungsgemäßen ACCasen
1	<i>Drosophila melanogaster</i>
2	<i>Heliothis virescens</i>
3	<i>Myzus persicae</i>

Tabelle 1

5 In der vorliegenden Anmeldung wird zum ersten Mal am Beispiel der ACCase aus der Pfirsichblattlaus *Myzus persicae* gezeigt, dass ACCasen Zielproteine (Targets) für insektizide Wirkstoffe sind und zur Identifizierung neuer, verbesserter insektizider Wirkstoffe in dafür geeigneten Verfahren (Assays) eingesetzt werden können.

10 Besonders sind dabei die ACCase aus *Myzus persicae* und *Drosophila melanogaster* zur Identifizierung neuer insektizider und gegebenenfalls auch akarizider Wirkstoffe geeignet.

15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist deshalb die Verwendung von Polypeptiden aus Insekten mit der biologischen Aktivität einer ACCase sowie diese kodierende Nukleinsäuren zum Identifizieren von Modulatoren der ACCase in Insekten und/oder Akarina, insbesondere von solchen Polypeptiden, die direkt aus Insekten isoliert wurden oder die von aus Insekten stammenden Nukleinsäuresequenzen oder Fragmenten davon kodiert und durch in vivo oder in vitro Verfahren  
20 gewonnen werden. Besonders bevorzugt handelt es sich bei den Polypeptiden um solche, die zur ACCase aus *Myzus persicae* oder *Drosophila melanogaster* eine Identität von 60%, bevorzugt 80%, besonders bevorzugt 90% und besonders bevorzugt von 95% über eine Länge von wenigstens 20, vorzugsweise wenigstens 25, besonders bevorzugt wenigstens 30 fortlaufenden Aminosäuren und ganz  
25 besonders bevorzugt über die Gesamtlänge aufweisen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist besonders die Verwendung der ACCase aus Insekten der Familie der Aphididae und der Dipteren.

5      Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist besonders die Verwendung der ACCase aus *Myzus persicae* und der ACCase aus *Drosophila melanogaster* gemäß SEQ ID NO: 2 sowie dazu homologer Polypeptide zum Identifizieren von Modulatoren der ACCase aus Insekten.

10      Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist im Besonderen die Verwendung der ACCase aus *Myzus persicae* zum Identifizieren von Modulatoren der ACCase aus Insekten.

Ganz besonders bevorzugt umfassen die erfindungsgemäßen Polypeptide damit eine Sequenz ausgewählt aus

15

a)      der Sequenz isoliert aus *Myzus persicae*,

b)      der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2,

20      c)      der Sequenz kodiert von der Nukleinsäure gemäß Accession Number AAF59156,

d)      Teilsequenzen der unter a) bis c) genannten Sequenzen, die noch die biologische Aktivität einer ACCase besitzen,

25

e)      Sequenzen, welche eine zumindest 60 %ige, bevorzugt eine 80 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige und ganz besonders bevorzugt eine 95% Identität mit den unter a) bis d) genannten Sequenzen aufweisen.

Der Grad der Identität der Aminosäuresequenzen wird vorzugsweise bestimmt mit Hilfe des Programms GAP aus dem Programmpaket GCG, Version 10.0 unter Standardeinstellungen (Devereux et al. 1984).

- 5      Gegenstand der vorliegenden Verwendung ist ebenfalls die Verwendung von für ACCasen kodierend Nukleinsäuren aus Insekten zum Identifizieren von Modulatoren der ACCase in Insekten und/oder Akarina.

10      Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist insbesondere auch die Verwendung der für die ACCase aus *Myzus persicae* kodierenden Nukleinsäure sowie der für die ACCase aus *Drosophila melanogaster* kodierende Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO: 1 zum Identifizieren von Modulatoren der ACCase, sowie dazu zu 60%, bevorzugt zu 80%, besonders bevorzugt zu 90% und besonders bevorzugt zu 95% homologer Nukleinsäuresequenzen.

15

Bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren handelt es sich insbesondere um einzelsträngige oder doppelsträngige Desoxyribonukleinsäuren (DNA) oder Ribonukleinsäuren (RNA). Bevorzugte Ausführungsformen sind Fragmente genomischer DNA, die Introns enthalten können, und cDNAs.

20

Der Ausdruck "cDNA" wie er hierin verwendet wird, bezeichnet eine einzel- oder doppelsträngige Kopie eines RNA-Moleküls und ist deshalb als Kopie einer biologisch aktiven RNA intronfrei, d. h. alle kodierenden Regionen eines Gens sind in zusammenhängender Form enthalten.

25

Der Begriff "Identität", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf die Zahl von Sequenzpositionen die in einem Alignment identisch sind. Sie wird meist in Prozent der Alignment Länge angegeben.

30

Der Begriff "Prozent (%) Identität", wie er hierin in Bezug auf eine bestimmte Sequenz oder einen bestimmten Teil dieser Sequenz verwendet wird, ist definiert als

der Prozentanteil von Nukleotiden im untersuchten Nukleinsäuremolekül, der mit den Nukleotiden der genannten bestimmten Sequenz oder eines bestimmten Teils dieser Sequenz identisch ist, wenn man die Sequenzen miteinander vergleicht ("Alignment") und wenn nötig so genannte "Gaps" einführt, um den maximalen  
5 Prozentsatz an identischen Sequenzen zu erhalten, wobei alle Parameter des verwendeten Programms auf "default" gesetzt sind.

Der Begriff "Ähnlichkeit", wie er hierin verwendet wird, setzt dagegen die Definition einer Ähnlichkeitsmetrik voraus, also eines Maßes dafür, als wie ähnlich man  
10 beispielsweise ein Valin zu einem Threonin oder zu einem Leucin annehmen möchte.

Der Begriff „Prozent (%) Ähnlichkeit“, wie er hierin verwendet wird, entspricht dem vorstehend beschriebenen Begriff „Prozent (%) Identität“, wobei hier für die Berechnung der %-Zahl die konservativen Aminosäuresubstitutionen zusätzlich zu  
15 den identischen Aminosäuren mit einbezogen werden.

Der Begriff "Homologie", wie er hierin verwendet wird, bedeutet wiederum evolutionäre Verwandtschaft. Zwei homologe Proteine haben sich aus einer gemeinsamen Vorläufersequenz entwickelt. Der Begriff hat nicht unbedingt etwas mit  
20 Identität oder Ähnlichkeit zu tun, abgesehen davon, dass homologe Sequenzen meist ähnlicher sind (oder in einem Alignment mehr identische Positionen besitzen) als nicht-homologe Sequenzen.

Bevorzugt handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren um DNA oder  
25 DNA-Fragmente, die genomischer DNA aus Insekten entsprechen, wobei die Nukleinsäuren bevorzugt aus Dipteren, besonders bevorzugt aus *Drosophilidae* stammen.

Besonders bevorzugt handelt es sich bei den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren um  
30 DNA oder DNA-Fragmente, die genomischer DNA von *Myzus persicae* oder *Drosophila melanogaster* entsprechen.

Ganz besonders bevorzugt umfassen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren eine Sequenz ausgewählt aus

- 5 a) der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1,
- b) der Sequenz gemäß Accession Number AAF59156,
- 10 c) zumindest 14 Basenpaare langen Teilsequenzen der unter a) oder b) definierten Sequenzen,
- d) Sequenzen, welche bei einer Hybridisierungstemperatur von 37°C bis 50°C an die unter a) oder b) definierten Sequenzen hybridisieren,
- 15 e) Sequenzen, welche eine zumindest 60 %ige, bevorzugt eine 80 %ige, besonders bevorzugt eine 90 %ige und ganz besonders eine 95%ige Identität mit den unter a) und b) definierten Sequenzen aufweisen,
- 20 f) Sequenzen, welche zu den unter a) bis e) definierten Sequenzen komplementär sind, und
- g) Sequenzen, welche aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes für dieselbe Aminosäuresequenz codieren wie die unter a) bis e) definierten Sequenzen.

25

Eine ganz besonders bevorzugte Ausführungsform der erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäuren stellt ein cDNA-Molekül mit der für ACCase aus *Myzus persicae* kodierenden Sequenz sowie der für ACCase aus *Drosophila melanogaster* kodierenden Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1 dar.

30

Die für die ACCase aus *Myzus persicae* kodierende Nukleinsäuresequenz kann auf Basis des genetischen Codes von der Aminosäuresequenz abgeleitet werden, die wie in Beispiel 3 beschrieben isoliert und durch Sequenzierung definiert werden kann.

- 5 Auf Grund der Degeneriertheit des genetischen Codes ist es wichtig, die abgeleitete Nukleinsäuresequenz zu nutzen, um die tatsächlich in *Myzus persicae* vorliegende Nukleinsäuresequenz zu überprüfen und gegebenenfalls die abgeleitete Sequenz zu korrigieren, soweit dies sinnvoll erscheint.
- 10 Die Isolierung bzw. Überprüfung der genomischen *M. persicae* Sequenz kann z.B. durch die Verwendung von aus der abgeleiteten Nukleinsäuresequenz abgeleiteten Primern erfolgen, die in PCR-Reaktionen zur Amplifikation der Zielsequenz nach dem Fachmann bekannten Methoden genutzt werden können.
- 15 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch die Polypeptide, die von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodiert werden.

Der Ausdruck "hybridisieren", wie er hierin verwendet wird, beschreibt den Vorgang, bei welchem ein einzelsträngiges Nukleinsäuremolekül mit einem  
20 komplementären Strang eine Basenpaarung eingeht. Auf diese Weise können ausgehend von der hierin genannten oder ableitbaren Sequenzinformation beispielsweise DNA-Fragmente aus anderen Insekten als *Drosophila melanogaster* isoliert werden, welche für ACCasen kodieren, welche dieselben oder ähnliche Eigenschaften einer der erfindungsgemäßen ACCasen aufweisen.

25

Hybridisierungsbedingungen werden nach folgender Formel näherungsweise berechnet:

Schmelztemperatur  $T_m = 81,5^{\circ}\text{C} + 16,6 (\log[c(\text{Na}^+)]) + 0,41(\% \text{ G} + \text{C}) - 500/n$   
30 (Lottspeich & Zorbas 1998).

Dabei ist  $c$  die Konzentration und  $n$  die Länge des hybridisierenden Sequenzabschnitts in Basenpaaren. Für eine Sequenz  $>100$  bp entfällt der Ausdruck  $500/n$ . Mit höchster Stringenz wird bei einer Temperatur  $5-15^{\circ}\text{C}$  unterhalb  $T_m$  und einer Ionenstärke von  $15\text{ mM Na}^+$  (entspricht  $0.1 \times \text{SSC}$ ) gewaschen. Wird eine RNA-Probe zur Hybridisierung verwendet, so ist der Schmelzpunkt um  $10-15^{\circ}\text{C}$  höher.

Bevorzugte Hybridisierungsbedingungen sind nachstehend angegeben:

Hybridisierungslösung: DIG Easy Hyb (Roche, ZZ) Hybridisierungstemperatur:  
37°C bis 50°C, bevorzugt 42°C (DNA-DNA), 50°C (DNA-RNA).

1. Waschschrift:  $2 \times \text{SSC}$ ,  $0,1\%$  SDS  $2 \times 5$  min bei Raumtemperatur;
2. Waschschrift:  $1 \times \text{SSC}$ ,  $0,1\%$  SDS  $2 \times 15$  min bei  $50^{\circ}\text{C}$ ; bevorzugt  $0,5 \times \text{SSC}$ ,  $0,1\%$  SDS  $2 \times 15$  min bei  $65^{\circ}\text{C}$ ; besonders bevorzugt  $0,2 \times \text{SSC}$ ,  $2 \times 15$  min bei  $68^{\circ}\text{C}$ .

Der Grad der Identität der Nukleinsäuren wird vorzugsweise bestimmt mit Hilfe des Programms NCBI BLASTN Version 2.0.4. (Altschul et al. 1997).

Der Ausdruck "regulatorische Regionen", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf nicht-translatierte Regionen des betreffenden Gens, wie Promotoren, Enhancer, Repressor- oder Aktivator-Bindungsstellen oder Terminationssequenzen, die mit zellulären Proteinen interagieren, wodurch die Transkription gesteuert wird.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ebenfalls DNA Konstrukte, die eine erfindungsgemäß zu verwendende Nukleinsäure und einen heterologen Promotor umfassen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist weiterhin die Verwendung solcher DNA-Konstrukten zum Identifizieren von Modulatoren der ACCase.

Der Ausdruck "heterologer Promotor", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf einen Promotor, der andere Eigenschaften als derjenige Promotor aufweist, der im Ursprungsorganismus die Expression des betreffenden Gens kontrolliert.

- 5 Die Auswahl von heterologen Promotoren ist davon abhängig, ob zur Expression pro- oder eukaryotische Zellen oder zellfreie Systeme verwendet werden. Beispiele für heterologe Promotoren sind der frühe oder späte Promotor des SV40, des Adenovirus oder des Cytomegalovirus, das lac-System, das trp-System, die Haupt-Operator- und Promotorregionen des Phagen lambda, die Kontrollregionen des fd-  
10 Hüllproteins, der Promotor der 3-Phosphoglyceratkinase, der Promotor der Sauren Phosphatase, der Baculovirus immediate early Promoter und der Promotor des  $\alpha$ -Mating-Faktors der Hefe.

- Gegenstand der Erfindung sind weiterhin Vektoren, die eine erfindungsgemäße  
15 Nukleinsäure bzw. ein erfindungsgemäßes DNA-Konstrukt enthalten. Als Vektoren können alle in molekularbiologischen Laboratorien verwendete Plasmide, Phasmide, Cosmide, YACs oder künstliche Chromosomen verwendet werden.

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner die Verwendung von Vektoren, die  
20 eine erfindungsgemäß zu verwendende Nukleinsäure, oder ein erfindungsgemäß zu verwendendes DNA-Konstrukt enthalten, in Verfahren zum Identifizieren von Modulatoren der ACCase.

- Als Vektoren können alle in molekularbiologischen Laboratorien verwendete  
25 Phagen, Plasmide, Phagmide, Phasmide, Cosmide, YACs, BACs, künstliche Chromosomen oder Partikel, die für einen Partikelbeschuss geeignet sind, verwendet werden.

- Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch Wirtszellen, die eine erfindungs-  
30 gemäß zu verwendende Nukleinsäure, ein erfindungsgemäß zu verwendendes DNA-Konstrukt oder einen erfindungsgemäß zu verwendenden Vektor enthalten.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch die Verwendung solcher Wirtszellen zum Identifizieren von Modulatoren der ACCase.

- 5     Der Ausdruck "Wirtszelle", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf Zellen, die natürlicherweise die erfindungsgemäß zu verwendenden Nukleinsäuren nicht enthalten.

10     Als Wirtszellen eignen sich sowohl prokaryotische Zellen, wie Bakterien der Gattungen Bacillus, Pseudomonas, Streptomyces, Streptococcus, Staphylococcus, vorzugsweise E. coli, als auch eukaryotische Zellen, wie Hefen, Säuger-, Amphibien-, Insekten- oder Pflanzenzellen. Bevorzugte eukaryotische Wirtszellen sind HEK-293-, Schneider S2-, Spodoptera Sf9-, Kc-, CHO-, COS1-, COS7-, HeLa-, C127-, 3T3- oder BHK-Zellen und insbesondere Xenopus-Oocyten.

- 15     Der Ausdruck "Polypeptide", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich sowohl auf kurze Aminosäureketten, die gewöhnlich als Peptide, Oligopeptide oder Oligomere bezeichnet werden, als auch auf längere Aminosäureketten, die gewöhnlich als Proteine bezeichnet werden. Er umfasst Aminosäureketten, die entweder durch natürliche Prozesse, wie posttranslationale Prozessierung, oder durch chemische Verfahren, die Stand der Technik sind, modifiziert sein können. Solche Modifikationen können an verschiedenen Stellen und mehrfach in einem Polypeptid vorkommen, wie beispielsweise am Peptid-Rückgrat, an der Aminosäure-Seitenkette, am Amino- und/oder am Carboxy-Terminus. Sie umfassen beispielsweise Acetylierungen, 20     Acylierungen, ADP-Ribosylierungen, Amidierungen, kovalente Verknüpfungen mit Flavinen, Häm-Anteilen, Nukleotiden oder Nukleotid-Derivaten, Lipiden oder Lipid-Derivaten oder Phosphatidylinositol, Cyclisierungen, Disulfidbrückenbildungen, Demethylierungen, Cystin-Bildungen, Formylierungen, gamma-Carboxylierungen, Glycosylierungen, Hydroxylierungen, Iodierungen, Methylierungen, Myristoylierungen, 25     Oxidationen, proteolytische Prozessierungen, Phosphorylierungen, Selenoylierungen und tRNA-vermittelte Additionen von Aminosäuren.
- 30

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können in der Form "reifer" Proteine oder als Teile größerer Proteine, z.B. als Fusionsproteine, vorliegen. Weiterhin können sie Sezernierungs- oder "Leader"-Sequenzen, Pro-Sequenzen, Sequenzen, die eine einfache Reinigung ermöglichen, wie mehrfache Histidin-Reste, oder zusätzliche stabilisierende Aminosäuren aufweisen. Die erfindungsgemäßen Proteine können ebenfalls so vorliegen, wie sie natürlicherweise in ihrem Herkunftsorganismus vorliegen, aus dem sie zum Beispiel direkt gewonnen werden können.

Der Begriff "vollständige ACCase" wie er hierin verwendet wird, beschreibt eine ACCase, die kodiert wird von einer vollständigen kodierenden Region einer Transkriptionseinheit beginnend mit dem ATG-Startcodon und umfassend alle informationstragenden Exonbereiche des im Herkunftsorganismus vorliegenden, für die ACCase kodierenden Gens, sowie für eine korrekte Termination der Transkription nötigen Signale.

Der Ausdruck "Gen" wie er hierin verwendet wird, ist die Bezeichnung für einen Abschnitt aus dem Genom einer Zelle, die für die Synthese einer Polypeptidkette verantwortlich ist.

20

Die erfindungsgemäßen Polypeptide müssen nicht vollständige ACCasen darstellen, sondern können auch nur Fragmente davon sein, solange sie zumindest die biologische Aktivität der vollständigen ACCase aufweisen. Polypeptide aus Insekten, die eine gleichartige biologische Aktivität wie eine ACCase aus *Myzus persicae* oder *Drosophila melanogaster* ausüben, werden noch als erfindungsgemäß betrachtet. Dabei müssen die erfindungsgemäßen Polypeptide den ACCasen aus *Myzus persicae* oder *Drosophila melanogaster* hinsichtlich ihrer Sequenz oder katalytischen Aktivität nicht völlig entsprechen. Als erfindungsgemäße Polypeptide werden auch Polypeptide betrachtet, die zur ACCase beispielsweise der folgenden Insekten oder zu Fragmenten davon, die noch die biologische Aktivität der ACCase ausüben können, homolog sind:

30

Aus der Ordnung der Isopoda z.B. *Oniscus asellus*, *Armadillidium vulgare*, *Porcellio scaber*.

5 Aus der Ordnung der Diplopoda z.B. *Blaniulus guttulatus*.

Aus der Ordnung der Chilopoda z.B. *Geophilus carpophagus*, *Scutigera* spp..

Aus der Ordnung der Symphyla z.B. *Scutigera immaculata*.

10

Aus der Ordnung der Thysanura z.B. *Lepisma saccharina*.

Aus der Ordnung der Collembola z.B. *Onychiurus armatus*.

15 Aus der Ordnung der Orthoptera z.B. *Acheta domesticus*, *Gryllotalpa* spp., *Locusta migratoria migratorioides*, *Melanoplus* spp., *Schistocerca gregaria*.

Aus der Ordnung der Blattaria z.B. *Blatta orientalis*, *Periplaneta americana*, *Leucophaea maderae*, *Blattella germanica*.

20

Aus der Ordnung der Dermaptera z.B. *Forficula auricularia*.

Aus der Ordnung der Isoptera z.B. *Reticulitermes* spp..

25 Aus der Ordnung der Phthiraptera z.B. *Pediculus humanus corporis*, *Haematopinus* spp., *Linognathus* spp., *Trichodectes* spp., *Damalinia* spp..

Aus der Ordnung der Thysanoptera z.B. *Hercinothrips femoralis*, *Thrips tabaci*, *Thrips palmi*, *Frankliniella accidentalis*.

30

Aus der Ordnung der Heteroptera z.B. *Eurygaster* spp., *Dysdercus intermedius*, *Piesma quadrata*, *Cimex lectularius*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma* spp.

5 Aus der Ordnung der Homoptera z.B. *Aleurodes brassicae*, *Bemisia tabaci*,  
*Trialeurodes vaporariorum*, *Aphis gossypii*, *Brevicoryne brassicae*, *Cryptomyzus*  
*ribis*, *Aphis fabae*, *Aphis pomi*, *Eriosoma lanigerum*, *Hyalopterus arundinis*,  
*Phylloxera vastatrix*, *Pemphigus* spp., *Macrosiphum avenae*, *Myzus* spp., *Phorodon*  
10 *humuli*, *Rhopalosiphum padi*, *Empoasca* spp., *Euscelis bilobatus*, *Nephotettix*  
*cincticeps*, *Lecanium corni*, *Saissetia oleae*, *Laodelphax striatellus*, *Nilaparvata*  
*lugens*, *Aonidiella aurantii*, *Aspidiotus hederae*, *Pseudococcus* spp., *Psylla* spp.

Aus der Ordnung der Lepidoptera z.B. *Pectinophora gossypiella*, *Bupalus piniarius*,  
*Cheimatobia brumata*, *Lithocolletis blancardella*, *Hyponomeuta padella*, *Plutella*  
*xylostella*, *Malacosoma neustria*, *Euproctis chrysorrhoea*, *Lymantria* spp.,  
15 *Bucculatrix thurberiella*, *Phyllocnistis citrella*, *Agrotis* spp., *Euxoa* spp., *Feltia* spp.,  
*Earias insulana*, *Heliothis* spp., *Mamestra brassicae*, *Panolis flammea*, *Spodoptera*  
spp., *Trichoplusia ni*, *Carpocapsa pomonella*, *Pieris* spp., *Chilo* spp., *Pyrausta*  
*nubilalis*, *Ephestia kuehniella*, *Galleria mellonella*, *Tineola bisselliella*, *Tinea*  
*pellionella*, *Hofmannophila pseudospretella*, *Cacoecia podana*, *Capua reticulana*,  
20 *Choristoneura fumiferana*, *Clysia ambiguella*, *Homona magnanima*, *Tortrix*  
*viridana*, *Cnaphalocerus* spp., *Oulema oryzae*.

Aus der Ordnung der Coleoptera z.B. *Anobium punctatum*, *Rhizopertha dominica*,  
*Bruchidius obtectus*, *Acanthoscelides obtectus*, *Hylotrupes bajulus*, *Agelastica alni*,  
25 *Leptinotarsa decemlineata*, *Phaedon cochleariae*, *Diabrotica* spp., *Psylliodes*  
*chrysocephala*, *Epilachna varivestis*, *Atomaria* spp., *Oryzaephilus surinamensis*,  
*Anthonomus* spp., *Sitophilus* spp., *Otiorrhynchus sulcatus*, *Cosmopolites sordidus*,  
*Ceuthorrhynchus assimilis*, *Hypera postica*, *Dermestes* spp., *Trogoderma* spp.,  
*Anthrenus* spp., *Attagenus* spp., *Lyctus* spp., *Meligethes aeneus*, *Ptinus* spp., *Niptus*  
30 *hololeucus*, *Gibbium psylloides*, *Tribolium* spp., *Tenebrio molitor*, *Agriotes* spp.,

*Conoderus* spp., *Melolontha melolontha*, *Amphimallon solstitialis*, *Costelytra zealandica*, *Lissorhoptrus oryzophilus*.

5 Aus der Ordnung der Hymenoptera z.B. *Diprion* spp., *Hoplocampa* spp., *Lasius* spp.,  
*Monomorium pharaonis*, *Vespa* spp.

10 Aus der Ordnung der Diptera z.B. *Aedes* spp., *Anopheles* spp., *Culex* spp.,  
*Drosophila melanogaster*, *Musca* spp., *Fannia* spp., *Calliphora erythrocephala*,  
*Lucilia* spp., *Chrysomyia* spp., *Cuterebra* spp., *Gastrophilus* spp., *Hyppobosca* spp.,  
*Stomoxys* spp., *Oestrus* spp., *Hypoderma* spp., *Tabanus* spp., *Tannia* spp., *Bibio hortulanus*,  
*Oscinella frit*, *Phorbia* spp., *Pegomyia hyoscyami*, *Ceratitis capitata*,  
*Dacus oleae*, *Tipula paludosa*, *Hylemyia* spp., *Liriomyza* spp..

15 Aus der Ordnung der Siphonaptera z.B. *Xenopsylla cheopis*, *Ceratophyllus* spp..

20 Die erfindungsgemäßen Polypeptide können im Vergleich zu den entsprechenden  
Regionen von natürlich vorkommenden ACCasen Deletionen oder Amino-  
säuresubstitutionen aufweisen, solange sie zumindest noch eine biologische Aktivität  
der vollständigen ACCasen ausüben. Konservative Substitutionen sind bevorzugt.  
Solche konservativen Substitutionen umfassen Variationen, wobei eine Aminosäure  
durch eine andere Aminosäure aus der folgenden Gruppe ersetzt wird:

1. Kleine aliphatische, nicht-polare oder wenig polare Reste: Ala, Ser, Thr, Pro und Gly;
- 25 2. Polare, negativ geladene Reste und deren Amide: Asp, Asn, Glu und Gln;
3. Polare, positiv geladene Reste: His, Arg und Lys;
4. Große aliphatische, nicht-polare Reste: Met, Leu, Ile, Val und Cys; und
5. Aromatische Reste: Phe, Tyr und Trp.

30 Die folgende Liste zeigt bevorzugte konservative Substitutionen:

Ursprünglicher Rest	Substitution
Ala	Gly, Ser
Arg	Lys
Asn	Gln, His
Asp	Glu
Cys	Ser
Gln	Asn
Glu	Asp
Gly	Ala, Pro
His	Asn, Gln
Ile	Leu, Val
Leu	Ile, Val
Lys	Arg, Gln, Glu
Met	Leu, Tyr, Ile
Phe	Met, Leu, Tyr
Ser	Thr
Thr	Ser
Trp	Tyr
Tyr	Trp, Phe
Val	Ile, Leu

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind deshalb ebenfalls Polypeptide, welche zumindest die biologische Aktivität einer ACCase ausüben und eine Aminosäuresequenz umfassen, die eine zumindest 60 %ige Identität, vorzugsweise 80 %ige, besonders bevorzugt 90 %ige Identität und ganz besonders bevorzugt eine 95% ige Identität mit der Sequenz aus *Myzus persicae* oder der von der Nukleinsäure gemäß SEQ ID NO: 1 kodierten Sequenz aus *Drosophila melanogaster* aufweisen, sowie deren Verwendung zur Identifizierung von Modulatoren der ACCase.

Der Ausdruck "biologische Aktivität einer ACCase", wie er hierin verwendet wird, bedeutet die Fähigkeit, die Biotin-abhängige Carboxylierung von Acetyl-CoA zu

katalysieren. Davon können alle drei Enzymfunktionen, d.h. die ATP-abhängige Abspaltung einer CO<sub>2</sub>-Gruppe aus Bicarbonat, die Biotin-Carrier-Funktion sowie die Carboxylierung von Acetyl-CoA, aber auch nur eine oder zwei dieser Reaktionen umfasst sein.

5

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können auf die übliche Weise hergestellt werden. Beispielsweise können die Nukleinsäuremoleküle vollständig chemisch synthetisiert werden. Man kann auch kurze Stücke der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren chemisch synthetisieren und solche Oligonukleotide radioaktiv oder mit einem Fluoreszenzfarbstoff markieren. Die markierten Oligonukleotide können auch verwendet werden, um ausgehend von Insekten-mRNA hergestellte cDNA-Banken zu durchsuchen. Klone, an die die markierten Oligonukleotide hybridisieren, werden zur Isolierung der betreffenden DNA-Fragmente ausgewählt. Nach der Charakterisierung der isolierten DNA erhält man auf einfache Weise die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren.

10  
15

Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren können auch mittels PCR-Verfahren unter Verwendung chemisch synthetisierter Oligonukleotide hergestellt werden.

20

Der Ausdruck "Oligonukleotid(e)", wie er hierin verwendet wird, bedeutet DNA-Moleküle, die aus 10 bis 50 Nukleotiden, vorzugsweise 15 bis 30 Nukleotiden, bestehen. Sie werden chemisch synthetisiert und können als Sonden verwendet werden.

25

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Polypeptide, insbesondere des von der Nukleinsäuresequenz gemäß SEQ ID NO: 1 kodierten Polypeptids, können außerdem Wirtszellen, die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren enthalten, unter geeigneten Bedingungen kultiviert werden. Die gewünschten Polypeptide können danach auf übliche Weise aus den Zellen oder dem Kulturmedium isoliert werden. Die Polypeptide können auch in *in vitro*-Systemen hergestellt werden.

30

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen ACCase aus *Myzus persicae* werden z.B. Larven oder Adulte im Mörser homogenisiert. Hierzu können sie vorher z.B. in flüssigem Stickstoff schockgefroren werden. Das Homogenat wird in einem geeigneten Puffer aufgenommen. Ein Beispiel für die Herstellung eines erfindungsgemäßen Polypeptids ist unter Beispiel 3 angegeben.

Ein mögliches Reinigungsverfahren der ACCase basiert auf präparativer Elektrophorese, FPLC, HPLC (z.B. unter Anwendung von Gelfiltrations-, Reversphasen- oder leicht hydrophoben Säulen), Gelfiltration, differentieller Präzipitation, Ionenaustausch-Chromatographie oder Affinitätschromatographie.

Ein schnelles Verfahren zum Isolieren der erfindungsgemäßen Polypeptide, die von Wirtszellen unter Verwendung einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure synthetisiert werden, beginnt mit der Expression eines Fusionsproteins, wobei der Fusionspartner auf einfache Weise affinitätsgereinigt werden kann. Der Fusionspartner kann beispielsweise Glutathion S-Transferase sein. Das Fusionsprotein kann dann an einer Glutathion-Affinitätssäule gereinigt werden. Der Fusionspartner kann durch partielle proteolytische Spaltung beispielsweise an Linkern zwischen dem Fusionspartner und dem zu reinigenden erfindungsgemäßen Polypeptid abgetrennt werden. Der Linker kann so gestaltet werden, dass er Ziel-Aminosäuren, wie Arginin- und Lysin-Reste einschließt, die Stellen für eine Spaltung durch Trypsin definieren. Um solche Linker zu erzeugen, können Standard-Klonierungsverfahren unter Verwendung von Oligonukleotiden angewendet werden.

Weitere mögliche Reinigungsverfahren basieren wiederum auf präparativer Elektrophorese, FPLC, HPLC (z.B. unter Anwendung von Gelfiltrations-, Reversphasen- oder leicht hydrophoben Säulen), Gelfiltration, differentieller Präzipitation, Ionenaustausch-Chromatographie und Affinitätschromatographie.

Die Ausdrücke "Isolierung oder Reinigung", wie sie hierin verwendet werden, bedeuten, dass die erfindungsgemäßen Polypeptide von anderen Proteinen oder anderen

Makromolekülen der Zelle oder des Gewebes abgetrennt werden. Vorzugsweise ist eine die erfindungsgemäßen Polypeptide enthaltende Zusammensetzung hinsichtlich des Proteingehalts gegenüber einer Präparation aus den Wirtszellen mindestens 10-fach und besonders bevorzugt mindestens 100-fach angereichert.

5

Die erfindungsgemäßen Polypeptide können auch ohne Fusionspartner mit Hilfe von Antikörpern, die an die Polypeptide binden, affinitätsgereinigt werden.

10

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Verfahren zum Auffinden von chemischen Verbindungen, die an die ACCase binden und/oder deren Eigenschaften verändern. Aufgrund der wichtigen Funktion der ACCase stellen Modulatoren, die die Aktivität beeinflussen, neue insektizide und/oder gegebenenfalls akarizide Wirkstoffe dar. Modulatoren können Agonisten oder Antagonisten bzw. Inhibitoren oder Aktivatoren sein.

15

20

Auf Grund der Eigenschaft, als Inhibitoren der ACCase aus Insekten zu wirken, können die genannten cyclischen 1,3-Dicarbonylverbindungen der Formel (I) sowie ihre Enole auch als gegebenenfalls markierte Kompetitoren in Verfahren zum Auffinden von Inhibitoren der ACCase aus Insekten verwendet werden, die nicht dieser Gruppe von Verbindungen angehören müssen.

25

Der Ausdruck "Kompetitor" wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf die Eigenschaft der Verbindungen, mit anderen, gegebenenfalls noch zu identifizierenden Verbindungen um die Bindung an der ACCase zu kompetitieren und diese vom Enzym zu verdrängen bzw. von dieser verdrängt zu werden.

30

Der Ausdruck "Agonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das die Aktivität der ACCase beschleunigt oder verstärkt.

Der Ausdruck "Antagonist", wie er hierin verwendet wird, bezieht sich auf ein Molekül, das die Aktivität der ACCase verlangsamt oder verhindert.

Der Ausdruck "Modulator", wie er hierin verwendet wird, stellt den Oberbegriff zu Agonist bzw. Antagonist dar. Modulatoren können kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an die erfindungsgemäßen Polypeptide binden und/oder deren Eigenschaften, z.B. deren enzymatische Aktivität, verändern. Weiterhin können Modulatoren kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an ein Molekül binden, welches wiederum an die erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, und/oder deren biologische Aktivität beeinflusst. Modulatoren können natürliche Substrate und Liganden darstellen oder strukturelle oder funktionelle Mimetika davon.

Vorzugsweise handelt es sich bei den Modulatoren um kleine organisch-chemische Verbindungen.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung konnte erstmals gezeigt werden, dass Verbindungen bzw. Modulatoren, die an der ACCase wirken, die zellulären Vorgänge auf eine Weise verändern können, die zum Absterben der damit behandelten Insekten führt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind deshalb auch Modulatoren von ACCasen aus Insekten, die mit Hilfe eines der in der vorliegenden Anmeldung beschriebenen Verfahrens zum Identifizieren von Modulatoren der ACCase gefunden werden.

Weiterhin umfasst die vorliegende Erfindung Verfahren zum Auffinden von chemischen Verbindungen, welche die Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide verändern. Auch solche "Expressionsmodulatoren" können neue insektizide Wirkstoffe darstellen. Expressionsmodulatoren können kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder Antikörper sein, die an die regulatorischen Regionen der für die erfindungsgemäßen Polypeptide kodierenden Nukleinsäuren binden. Weiterhin können Expressionsmodulatoren kleine organisch-chemische Moleküle, Peptide oder

Antikörper sein, die an ein Molekül binden, welches wiederum an regulatorische Regionen der für die erfindungsgemäßen Polypeptide kodierenden Nukleinsäuren bindet, und dadurch deren Expression beeinflusst. Expressionsmodulatoren können auch Antisense-Moleküle sein.

5

Die vorliegende Erfindung bezieht sich ebenfalls auf die Verwendung von Modulatoren der erfindungsgemäßen Polypeptide oder von Expressionsmodulatoren als Insektizide oder Akarazide.

10

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind ebenfalls Expressionsmodulatoren von ACCasen, die mit Hilfe des vorstehend beschriebenen Verfahrens zum Auffinden von Expressionsmodulatoren gefunden werden.

15

Die erfindungsgemäßen Verfahren schließen Hochdurchsatz-Screening (high throughput screening; HTS) und Ultra-Hochdurchsatz-Screening (UHTS) ein. Dafür können sowohl Wirtszellen als auch zellfreie Präparationen verwendet werden, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren und/oder die erfindungsgemäßen Polypeptide enthalten.

20

Um Modulatoren aufzufinden, kann ein synthetischer Reaktionsmix (z.B. Produkte der in vitro Transkription) oder ein zellulärer Bestandteil, wie eine Membran, ein Kompartiment oder irgendeine andere Präparation, die die erfindungsgemäßen Polypeptide enthält, zusammen mit einem markierten Substrat oder Liganden der Polypeptide in Gegenwart und Abwesenheit eines Kandidatenmoleküls, das ein Agonist oder Antagonist sein kann, inkubiert werden. Die Fähigkeit des Kandidatenmoleküls, die Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide zu erhöhen oder zu hemmen, wird erkennbar an einer erhöhten oder verringerten Bindung des markierten Liganden oder an einer erhöhten oder verringerten Umsetzung des markierten Substrates. Moleküle, die gut binden und zu einer erhöhten Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide führen, sind Agonisten. Moleküle, die gut binden, und die biologische Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide hemmen, sind

25

30

gute Antagonisten. Es kann sich dabei auch um Hemmstoffe der oben genannten insektiziden Stoffklasse handeln, jedoch können auch völlige neue Stoffklassen diese modulatorische Aktivität aufweisen.

5     Modulatoren, die die Aktivität eines erfindungsgemäßen Polypeptids oder die Expression erfindungsgemäßer ACCase kodierender mRNA und/oder Polypeptide um mindestens 10 %, mindestens 20 %, mindestens 30 %, mindestens 40 %, mindestens 50 %, mindestens 60 %, mindestens 70 %, mindestens 80 %, mindestens 90 % oder mindestens 95 % reduzieren, sind geeignet, um als Insektizide verwendet  
10    zu werden, oder zu solchen weiterentwickelt zu werden. Solche Kandidatenmoleküle werden dann in weiteren Tests auf Toxizität gegenüber Vertebratenspezies, wie z.B. Säuger und auf ihre Bioverfügbarkeit hin überprüft.

Die Detektion der biologischen Aktivität der erfindungsgemäßen Polypeptide kann  
15    durch ein so genanntes Reportersystem verbessert werden. Reportersysteme in dieser Hinsicht umfassen, sind aber nicht beschränkt auf colorimetrisch oder radioaktiv markierte Substrate, die in ein Produkt umgewandelt werden oder ein Reportergen, das auf Veränderungen der Aktivität oder der Expression der erfindungsgemäßen Polypeptide anspricht oder andere bekannte Bindungstests.

20    Die Aktivität vieler, z. B. membranständiger Proteine kann auf eine weitere Weise vorteilhaft gemessen werden. Die funktionelle heterologe Expression solcher Proteine in *E. coli* ist oft schwierig oder unmöglich. In diesem Fall kann durch geeignete Klonierung (z.B. unter Nutzung geeigneter PCR Strategien) der katalytisch  
25    aktive Teil des Proteins abgetrennt werden, so dass das Genprodukt ein (besser) lösliches Protein darstellt und leicht gereinigt werden kann. Zur Messung der Aktivität löslicher Proteine steht ein breites Repertoire von Meßmöglichkeiten zur Verfügung. Eine besonders empfindliche Messung kann z.B. unter Einsatz eines fluoreszenzmarkierten Liganden oder Substrates mittels Fluoreszenzpolarisation erfolgen.  
30

Ein weiteres Beispiel für ein Verfahren, mit welchem Modulatoren der erfindungsgemäßen Polypeptide aufgefunden werden können, ist ein Verdrängungstest, bei dem man unter dafür geeigneten Bedingungen die erfindungsgemäßen Polypeptide und einen potenziellen Modulator mit einem Molekül, das bekanntermaßen an die erfindungsgemäßen Polypeptide bindet, wie einem natürlichen Substrat oder Liganden oder einem Substrat- oder Liganden-Mimetikum zusammenbringt. Ein Beispiel dafür sind die vorstehend genannten Verbindungen der Formel (I). Die erfindungsgemäßen Polypeptide selbst können markiert werden, z.B. radioaktiv oder colorimetrisch, so dass man die Anzahl der Polypeptide, die an einen Liganden gebunden sind oder die eine Umsetzung mitgemacht haben, exakt bestimmen kann. Auf diese Weise lässt sich die Effektivität eines Agonisten oder Antagonisten ermes-  
sen.

Potentiell insektizide Verbindungen, die in einem der erfindungsgemäßen Verfahren mit Hilfe der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren- und/oder Polypeptide gefunden werden, können den Insekten auf verschiedenem Wege zugeführt werden, z.B. oral (siehe auch Beispiel 4), topisch oder durch Injektion. Insektizide sind häufig hydrophobe Moleküle und müssen dann gewöhnlich in organischen Lösungsmitteln gelöst werden, die auch verdampfen können (z.B. Methanol oder Aceton) oder die in geringen Konzentrationen zugesetzt werden, um die Aufnahme zu erleichtern (Ethanol, Dimethylsulfoxid).

Der erste Schritt bei Versuchen mit Insekten ist in der Regel die Bestimmung der MLD (minimal lethal dose) nach einer chronischen Exposition der Insekten. Die Verbindungen werden gewöhnlich verdünnt und dem Futter von 0 - 48 h Stunden alten Embryos und Larven zugesetzt. Zusätzlich zur MLD wird so auch der Anteil der Eier bestimmt, aus denen noch Larven schlüpfen, ebenso das Verhalten der Larven (Bewegung, Futteraufnahme), die Anzahl der sich noch verpuppenden Larven und der daraus hervorgehenden Adulten. Die Larven können weiterhin auf morphologische Defekte untersucht werden. Nach Bestimmung der MLD können die akute und chronische Dosis bestimmt werden.

In einem typischen akuten Test werden die Verbindungen der Nahrung von Embryos, Larven oder Adulten zugesetzt und die Insekten nach 2 Stunden und nach einer Übernachtsinkubation überprüft. Bei Embryos wird die Zahl der Embryos bestimmt, die Defekte in der Entwicklung aufweisen und der Anteil bestimmt, der bis zum Erwachsenenstadium überlebt.

Bei Larven werden z.B. Verhaltensstörungen, Störungen bei Bewegungsabläufen oder der Häutung geprüft. Bei erwachsenen Tieren werden Defekte bei der Menge oder der Aktivität von Enzymen sowie Verhaltens- und/oder Fertilitätsstörungen beobachtet.

Für Tests zur Bestimmung der chronischen Toxizität werden die Adulten z.B. für 48 Stunden in Schalen gesetzt, die die betreffende Verbindung enthalten, dann in einem sauberen Behälter transferiert und die Fruchtbarkeit der Tiere bzw. die Menge der Aktivität eines bestimmten Enzyms oder das Absterben der Insekten beobachtet.

Die folgenden Beispiele zeigen, dass die ACCase überraschenderweise ein essentielles Enzym in Insekten ist, und zeigen außerdem, dass das Enzym ein geeignetes Zielprotein für die Identifizierung von Insektiziden ist, in Verfahren zum Identifizieren von insektizid wirksamen Verbindungen verwendet werden kann und dass die in entsprechenden Verfahren identifizierten Modulatoren der ACCase als Insektizide verwendet werden können. Um die Verwendung der ACCase zu ermöglichen, wird beispielhaft die Gewinnung dieses Enzyms aus *Myzus persicae* beschrieben und schließlich die Anwendbarkeit der vorliegenden Erfindung für die Suche nach insektizid wirksamen Verbindungen demonstriert.

### Beispiele

#### **Beispiel 1: Herstellung einer ACCase Enzympräparation aus *Myzus persicae***

- 5      Larven oder Adulte von *Myzus persicae* werden gewogen und mit der dreifachen Menge an Extraktionspuffer im Mörser homogenisiert. Anschließend wird der Extrakt zweimal je 10 min mit 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand enthält die ACCase und wird für den Enzymtest zum Identifizieren von Inhibitoren verwendet.
- 10     Als Extraktionspuffer wird bevorzugt der folgende Puffer verwendet: 0,25 M Sucrose, 15 mM Tris/HCl pH 7,4, 4 mM EDTA, 10 mM Kaliumcitrat (alle Chemikalien von Sigma, St. Louis).

#### **Beispiel 2: Verfahren zum Auffinden von Modulatoren**

- 15      Die ACCase Enzympräparation wurde zur Auffindung von Modulatoren der ACCase in einem biochemischen Test wie folgt verwendet: Zunächst wurde ein Aliquot der Enzympräparation aus Beispiel 1 mit dem Reaktionspuffer und dem radioaktiv markierten Substrat gemischt und inkubiert. Zum Nachweis des Einbaus von CO<sub>2</sub>
- 20      wurde rauchende HCl zupipettiert, ein Aliquot des Reaktionsansatzes auf Watman-Filterpapier aufgetropft und getrocknet. Das getrocknete Filterpapier wurde mit Szintillationsflüssigkeit in Szintillationsröhrchen überführt. Die Messung erfolgte in einem Szintillationszähler (Beckman Instruments, Fullerton, USA). Zum Screening auf Modulatoren wurden die zu testenden Verbindungen in DMSO gelöst und vor
- 25      dem ersten Inkubationsschritt zusammen mit der Enzympräparation zum Reaktionsansatz hinzugegeben. Die Wirkung der Modulatoren wurde im Vergleich zur ACCase Aktivität in einem Reaktionsansatz mit Lösungsmittel aber ohne Modulator bestimmt. Abbildung 2a zeigt die Hemmung der ACCase aus *Myzus persicae* bei unterschiedlichen Wirkstoff-Konzentrationen. Abbildung 2b zeigt die Hemmung der
- 30      *Myzus persicae* ACCase durch unterschiedliche Wirkstoffe.

Als Reaktionspuffer wurde 50 mM Tris/HCl pH 7,4, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM ATP, 1 µg/µl Rinderserumalbumin, 10 mM Kaliumcitrat, 84 mM Natriumbicarbonat (alles von Sigma, St. Louis) verwendet.

Als radioaktiv markiertes Substrat wurde 4 mM <sup>14</sup>C Natriumbicarbonat verwendet.

5

### Beispiel 3:

#### Messung der ACCase-Aktivität zum Auffinden von Inhibitoren der ACCase

10 Einen Teilschritt der durch ACCase katalysierten Reaktion stellt die Fixierung der Carbonatgruppe an den Co-Faktor Biotin dar. Diese Fixierung geschieht unter ATP-Spaltung: ACCase-Biotin + HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> + ATP → ACCase-Biotin-CO<sub>2</sub><sup>-</sup> + ADP + P<sub>i</sub>. Für die Bestimmung der ACCase-Aktivität wird das freiwerdende Phosphat mit dem kommerziell erhältlichen Malachitgrün-Reagenz nachgewiesen. Da es sich somit um einen generellen (unspezifischen) Phosphatnachweis handelt, müssen alle ver-

15 wendeten Materialien und Reagenzien frei von Phosphat sein. Die ACCase muß für die Nachweisreaktion von anderen ATP-spaltenden Enzymen abgetrennt werden.

#### (a) Präparation der ACCase

20 Ganze Insekten oder aus diesen gewonnene Gewebe/Organe werden im Homogenisationspuffer (250 mM Sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 2 mM EDTA, 10 mM NaCitrat, Proteinaseinhibitoren-Mix (SIGMA P-8340)) zerkleinert (z.B. durch Zermörsern oder mittels eines Homogenisierstabs). Das homogenisierte Material wird dann zur Klärung abzentrifugiert. Der Überstand, der die ACCase

25 enthält, wird danach mittels einer 4 PD-10 Säule (Pharmacia Corporation, Peapack, New Jersey, USA) mit dem Laufpuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 10% Glycerol) für die weiteren Schritte umgepuffert. Dann folgt eine Auftrennung des Rohextraktes über eine Sephacryl 26/60 S-300 Säule (Pharmacia Corporation, Peapack, New Jersey, USA) mittels

30 FPLC (Pharmacia Corporation, Peapack, New Jersey, USA). Die gewonnenen Fraktionen werden wie unter (b) beschrieben auf ihre ACCase-Aktivität hin getestet.

Die Fraktionen mit den höchsten spezifischen ACCase-Aktivitäten werden vereinigt und stellen das Ausgangsmaterial für die unter (c) beschriebenen Inhibitor-Messungen dar (im folgenden als ACCase-Lösung bezeichnet).

5     (b) Aktivitätstest

Ein Aliquot der unter (a) beschriebenen ACCase-Lösung wird mit dem Reaktionspuffer (50 mM Tris-HCl pH 7,4, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1mg/ml Rinderserumalbumin, 20 mM NaCitrat, 5 mM NaHCO<sub>3</sub>, 1 mM ATP, 200µM Acetyl-CoA) vermischt und  
10     bei physiologischen Temperaturen (24°C bis 37°C) inkubiert. Nach Ablauf der gewünschten Reaktionszeit werden 2 Vol des Färbereagenzes (BiomolGreen (Biomol Research Laboratories Inc., Plymouth Meeting, PA, USA), angesetzt wie vom Hersteller beschrieben) hinzugefügt und wie vom Hersteller beschrieben bis zur Ausprägung der Nachweisreaktion weiter inkubiert. Zur Bestimmung der unspezi-  
15     fischen Hintergrundaktivität werden Reaktionsansätze bei Abwesenheit des Substrates Acetyl-CoA mitgemessen und bei der Berechnung der spezifischen ACCase-Aktivität entsprechend abgezogen.

(c) Verfahren zum Identifizieren von Inhibitoren der ACCase

20

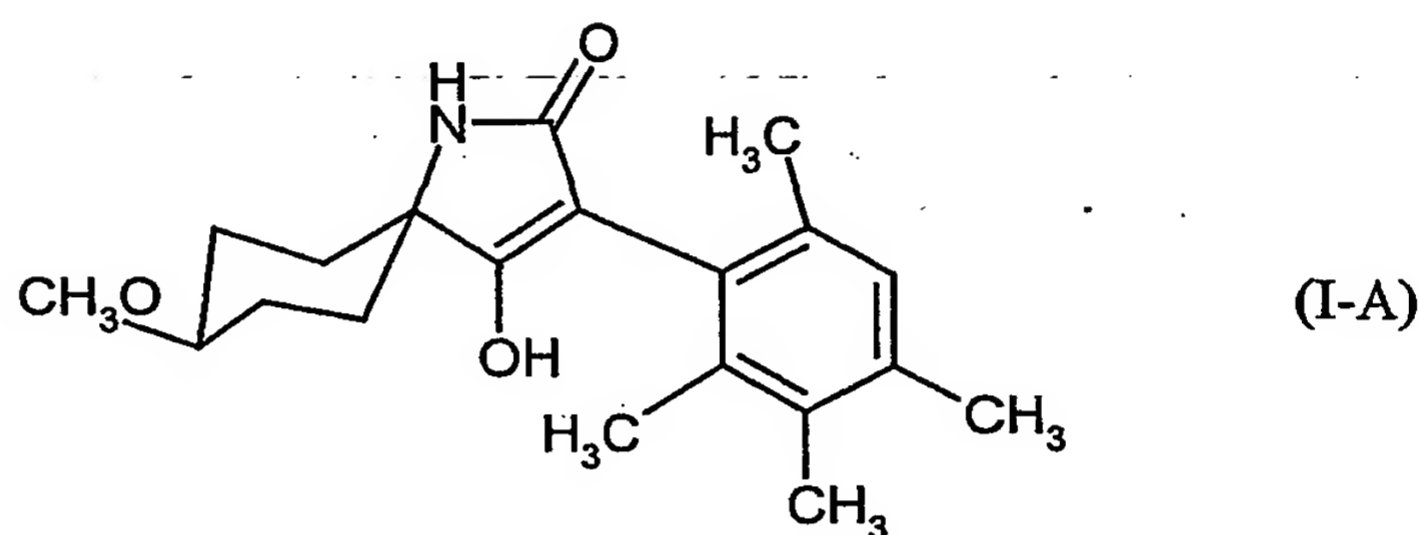
Zur Bestimmung der Hemmung der ACCase durch Testsubstanzen werden Aliquots der ACCase-Lösung aus(a) mit dem Reaktionspuffer und den zu testenden Inhibitoren vermischt und bei physiologischen Temperaturen (24°C bis 37°C) inkubiert. Nach der gewünschten Reaktionszeit erfolgt die Nachweisreaktion wie  
25     unter (b) beschrieben. Eine Kontrollmessung ohne Zugabe von Inhibitor wird parallel durchgeführt. Die Hemmung der ACCase berechnet sich dann im Vergleich zu dieser Kontrolle.

Bezugsquellen: alle Chemikalien, wenn nicht besonders aufgeführt, sind von Sigma-  
30     Aldrich Co., St. Louis, USA.

**Beispiel 4: Beeinträchtigung der Lipidneogenese durch Inhibitoren der ACCase**

Larven oder Adulte der Pfirsichblattlaus *Myzus persicae* wurden durch die Sacht-Methode (Nauen et al. 1996) für zwei Tage mit Nährlösungen mit und ohne einen der  
5 identifizierten Inhibitoren der ACCase gefüttert.

Beispielhaft wurde in diesem Versuch die Verbindung der nachfolgenden Formel (I-A)



10 verwendet, die als 4-hydroxy-8-methoxy-3-(2,3,4,6-tetramethylphenyl)-1-azaspiro-[4,5]dec-32-en-2-one bezeichnet werden kann.

Danach wurden die Tiere abgesammelt und mittels eines Mörsers in organischem Lösungsmittel homogenisiert. Durch mehrfaches Ausschütteln mit wässriger  
15 Lösung wurde die organische Phase von wasserlöslichen Bestandteilen gereinigt und dann das Lösungsmittel abgedampft. Das verbleibende Pellet wurde in wenig Lösungsmittel aufgenommen und mittels Dünnschichtchromatographie (DC) aufgetrennt. Die aufgetrennten Lipide wurden mit Amidoschwarz angefärbt. In Lipide eingebautes  $^{14}\text{C}$  Acetat wurde mittels Autoradiographie nach 2-3 Tagen  
20 Expositionszeit nachgewiesen. Zur Quantifizierung des  $^{14}\text{C}$  Einbaus in Lipide wurden nach der Färbung die entsprechenden Banden ausgekratzt, gelöst und die Aktivität im Szintillationszähler bestimmt. Abbildung 1a zeigt anhand eines aufgetrennten Lipidextraktes aus der Pfirsichblattlaus *Myzus persicae* den Lipid-Status nach Acetat-Fütterung ohne (Spuren 1-3) und mit dem Wirkstoff der Formel  
25 (I-A) (Spuren 4-6). Es sind keine signifikanten Unterschiede in Lipidkomposition und Lipidgehalt zu erkennen. Abbildung 1b zeigt die Autoradiographie der selben

DC Platte. Während in den Spuren 1-3 anhand der Schwärzung diejenigen Lipide erkennbar sind, in die in den Kontroll-Blattläusen radioaktiv markiertes Acetat bei der de novo Synthese eingebaut wurde, sind in den Wirkstoff-behandelten Pfirsichblattläusen keine markierten Lipide vorhanden. Somit hat keine de novo Lipid-Synthese aus Acetat stattgefunden. Abbildung 1c zeigt schematisch noch einmal, wieviel Acetat bei Anwesenheit eines Inhibitors der ACCase (0.01 ppm bis 100 ppm) noch bei der de novo Synthese im Vergleich zur Kontrolle ohne ACCase-Inhibitor eingebaut wurde. Es ist deutlich zu erkennen, dass bei zunehmender Konzentration des Inhibitors die de novo Lipid-Biosynthese zum Erliegen kommt.

10

Als Laufmittel für die DC Chromatographie wurde n-Hexan : Diethylether : Eisessig (60 : 45 : 1) verwendet.

## Beschreibung der Abbildungen

### Abbildung 1a)

5 Aufgetrennter Lipidextrakt aus der Pfirsichblattlaus *Myzus persicae* nach Acetat-Fütterung ohne (Spuren 1-3) und mit einem Inhibitor der ACCase (Spuren 4-6). Die aufgetrennten Lipide wurden mittels Amidoschwarz angefärbt.

### Abbildung 1b)

10 Autoradiographie der unter Abbildung 1a) gezeigten DC Platte.  $^{14}\text{C}$  Acetat wurde mittels eines Images nach 2-3 Tagen Expositionszeit nachgewiesen. Während in den Spuren 1-3 anhand der Schwärzung diejenigen Lipide erkennbar sind, in die in den Kontroll-Blattläusen radioaktiv markiertes Acetat bei der de novo Synthese eingebaut wurde, sind in den Wirkstoff-behandelten Pfirsichblattläusen keine markierten Lipide vorhanden.

15

### Abbildung 1c)

Einbau von  $^{14}\text{C}$  Acetat bei An- und Abwesenheit von Inhibitoren der ACCase (0.01 ppm bis 100 ppm) bei der de novo Synthese von Lipiden im Vergleich.

20

### Abbildung 2a)

Hemmung der ACCase aus *Myzus persicae* bei unterschiedlichen Wirkstoff-Konzentrationen. Lsngm = Lösungsmittel (Kontrolle). Vbdg = Verbindung (Wirkstoff).

25

### Abbildung 2b)

Hemmung der *Myzus persicae* ACCase durch unterschiedliche Wirkstoffe. Verbg = Verbindung.

**Abbildung 3)**

Hemmung der ACCase aus der Pfirsich-Blattlaus *Myzus persicae* durch zwei unterschiedliche Substanzen A und B. Die Abbildung zeigt die jeweilige ACCase-Aktivität bei unterschiedlichen Inhibitor-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle (Ansatz ohne Inhibitor, nicht gezeigt).

5

**Literatur**

5 Abu-Elheiga L. et al. (1994): Human acetyl-CoA carboxylase: characterization, molecular cloning, and evidence for two isoforms. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 92 (9), 4011-4015.

Altschul SF et al. (1997): Gapped BLAST und PSI-BLAST generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402.

10 Bailey A et al. (1995): The ACC1 gene, encoding acetyl-CoA carboxylase, is essential for growth in Ustilago maydis. Mol. Gen. Genet. 249 (2), 191-201.

Devereux J et al. (1984): A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucleic Acids Res. 12: 387-395.

15

Goffeau A et al. (1996): Life with 6000 genes. Science 274 (5287).

Gronwald JW (1994): Herbicides inhibiting acetyl-CoA carboxylase. Biochem. Soc. Trans. 22 (3): 616-621.

20

Haselkom R & Gornicki P (1999): Cyanobacterial and plant acetyl-CoA carboxylase, US 5972644.

25 Jenkins AR et al. (1992): Maize Acetyl CoA Carboxylase encoding DNA clones, WO 93/11243 A1.

- Ke J et al. (2000): Coordinate Regulation of the Nuclear and Plastidic Genes Coding for the Subunits of the Heteromeric Acetyl-Coenzyme A Carboxylase. *Plant Physiology* 122: 1057-1071.
- 5 Knowles JR (1989): The mechanism of biotin-dependent enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 58: 195-221.
- Lottspeich, F., Zorbas H. (Hrsg.). 1998. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin. Martinez-Zapater J.M. und Salina J. , 1998 Humana Press  
10 ISBN 0-89603-391-0.
- Mumberg D et al. (1995): Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156, 119-122.
- 15 Munday MR & Hemingway CJ (1999): The regulation of acetyl-CoA carboxylase - a potential for the action of hypolipidemic agents. *Adv. Enzyme Regul.* 39: 205-234.
- Nauen R et al. (1996) Aphicidal activity of imidacloprid against a tobacco feeding strain of *Myzus persicae* (Homoptera: Aphididae) from Japan closely related to  
20 *Myzus nicotinae* and highly resistant to carbamates and organophosphates. *Bull. Ent. Res.* 86: 165-171
- Puissant C & Houdebine LM (1990) : An improvement of the single-step method of the RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction.  
25 *BioTechniques* 8: 148-149.
- Somers DA (1999): DNA encoding oat acetyl CoA carboxylase, WO 99/67367 A1.

Sutter M. et al. (1991): Acaricides containing soraphen A or soraphen B , EP-A-412 937.

5 Vahlensieck HF et al. (1994): Identification of the yeast ACC1 gene product (acetyl-CoA carboxylase) as the target of the polyketide fungicide soraphen A. Curr. Genet. 25 (2): 95-100.

**Patentansprüche**

1. Nukleinsäure umfassend eine Sequenz ausgewählt aus
  - 5 (a) der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 1,
  - (b) der Sequenz gemäß Accession Number AAF59156,
  - 10 (c) zumindest 14 Basenpaare langen Teilsequenzen der unter (a) und (b) definierten Sequenzen,
  - (d) Sequenzen, welche aus Insekten stammen oder von solchen abgeleitet sind und die bei einer Hybridisierungstemperatur von 37°C bis 50°C an die unter (a) und (b) definierten Sequenzen hybridisieren,
  - 15 (e) Sequenzen, welche aus Insekten stammen oder von solchen abgeleitet sind und die eine zumindest 60 %ige Identität zu den unter (a) und (b) definierten Sequenzen aufweisen,
  - 20 (f) Sequenzen, welche zu den unter (a) bis (e) definierten Sequenz komplementär sind und
  - (g) Sequenzen, welche aufgrund der Degeneriertheit des genetischen Codes für dieselbe Aminosäuresequenz kodieren wie die unter (a) bis  
25 (e) definierten Sequenzen.
2. Vektor umfassend zumindest eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1.
3. Vektor nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Nukleinsäure-  
30 molekül funktionell mit regulatorischen Sequenzen verknüpft ist, die die Expression der Nukleinsäure in pro- oder eukaryotischen Zellen gewährleisten.

4. Wirtszelle enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 oder einen Vektor gemäß Anspruch 2 oder 3.
5. Wirtszelle gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um eine pro- oder eukaryotische Zelle handelt.
6. Wirtszelle gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die prokaryotische Zelle *E.coli* ist.
7. Wirtszelle gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß die eukaryotische Zelle eine Säuger- oder Insektenzelle ist.
8. Polypeptid mit einer Sequenz ausgewählt aus
  - a) der Sequenz mit der biologischen Aktivität einer Acetyl-CoA Carboxylase isoliert aus *Myzus persicae*,
  - b) der Sequenz gemäß SEQ ID NO: 2,
  - c) der Sequenz kodiert von einer Nukleinsäure gemäß Accession Number AAF59156,
  - d) Teilsequenzen der unter a) bis c) genannten Sequenzen, die noch die biologische Aktivität einer Acetyl-CoA Carboxylase besitzen,
  - e) Sequenzen, welche aus Insekten stammen oder von solchen abgeleitet sind und die eine zumindest 60 %ige Identität mit den unter a) bis d) genannten Sequenzen aufweisen.

9. Verfahren zum Herstellen eines Polypeptids gemäß Anspruch 8, umfassend
- 5 (a) das Kultivieren einer Wirtszelle gemäß einem der Ansprüche 4 bis 7 unter Bedingungen, die die Expression einer Nukleinsäure gemäß Anspruch 1 gewährleisten, und
- (b) die Gewinnung des Polypeptids aus der Zelle oder dem Kulturmedium.
- 10
10. Antikörper, welcher spezifisch mit einem Polypeptid gemäß Anspruch 8 reagiert.
11. Verwendung eines Polypeptids aus Insekten mit der biologischen Aktivität einer Acetyl-CoA Carboxylase zum Identifizieren von insektizid und/oder
- 15 akarizid wirksamen Verbindungen.
12. Verwendung gemäß Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Polypeptide gemäß Anspruch 8 handelt.
- 20
13. Verwendung von Nukleinsäuren, die für Polypeptide aus Insekten mit der biologischen Aktivität einer Acetyl-CoA Carboxylase kodieren, in Verfahren zum Identifizieren von Modulatoren dieser Polypeptide.
- 25
14. Verwendung von Nukleinsäuren, die für Polypeptide aus Insekten mit der biologischen Aktivität einer Acetyl-CoA Carboxylase kodieren, zum Identifizieren von Substanzen, welche die Expression der von ihnen kodierten Polypeptide verändern.
- 30
15. Verwendung gemäß Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um Fragmente genomischer DNA oder um cDNA handelt.

16. Verfahren zum Auffinden einer chemischen Verbindung, die an ein Polypeptid aus Insekten mit der biologischen Aktivität einer Acetyl-CoA Carboxylase bindet, umfassend die folgenden Schritte:

5

10

15

20

25

30

(a) Inkontaktbringen eines Polypeptids aus Insekten mit der biologischen Aktivität einer Acetyl-CoA Carboxylase oder einer Wirtszelle enthaltend ein solches Polypeptid mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen unter Bedingungen, die die Interaktion einer dieser chemischen Verbindungen mit dem Polypeptid erlauben, und

(b) Bestimmen der chemischen Verbindung, die spezifisch an das Polypeptid bindet.

17. Verfahren zum Identifizieren von Substanzen, die die Aktivität von Acetyl-CoA Carboxylase aus Insekten und/oder Akarina modulieren, dadurch gekennzeichnet, daß man

a) die Testsubstanz unter solchen Bedingungen mit Acetyl-CoA Carboxylase in Kontakt bringt, die eine Interaktion der Testsubstanz mit der Acetyl-CoA Carboxylase gestatten,

b) die erfolgte Interaktion der Testsubstanz detektiert, indem man die Fähigkeit der Acetyl-CoA Carboxylase zur Biotin-abhängigen Carboxylierung von Acetyl-CoA bestimmt, und

c) die Fähigkeit der Acetyl-CoA Carboxylase zur Biotin-abhängigen Carboxylierung von Acetyl-CoA bei Anwesenheit der Testsubstanz mit ihrer Fähigkeit zur Biotin-abhängigen Carboxylierung von Acetyl-CoA bei Abwesenheit einer Testsubstanz vergleicht.

18. Verfahren zum Auffinden einer Verbindung, welche die Expression von Polypeptiden aus Insekten mit der biologischen Aktivität einer Acetyl-CoA Carboxylase verändert, umfassend die folgenden Schritte:

5

- (a) Inkontaktbringen einer Wirtszelle enthaltend eine für ein Polypeptid aus Insekten mit der biologischen Aktivität einer Acetyl-CoA Carboxylase kodierende Nukleinsäure mit einer chemischen Verbindung oder einem Gemisch von chemischen Verbindungen,

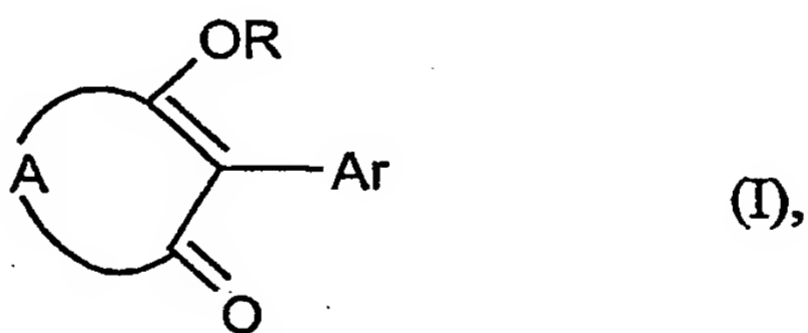
10

- (b) Bestimmen der Polypeptidkonzentration, und

15

- (c) Bestimmen der Verbindung, welche die Expression des Polypeptids spezifisch beeinflusst.

19. Verwendung von Verbindungen der Formel (I)



20

worin

Ar für substituiertes Aryl oder Hetaryl mit mindestens einem ortho-Substituenten steht,

25

R für H oder für Acylreste steht, und

- A mit den verknüpften C-Atomen einen gegebenenfalls substituierten 5- oder 6- gliedrigen Carbo- oder Heterocyclus bildet, wobei als Heteroatome beispielsweise N, O und/oder S in Frage kommen,
- 5 als Inhibitoren der Acetyl-CoA Carboxylase aus Insekten.
21. Verwendung von Verbindungen der Formel (I) gemäß Anspruch 20 in Verfahren gemäß Anspruch 17 und 18.
- 10 22. Modulatoren der Acetyl-CoA Carboxylase aus Insekten und/oder Akarina, die mittels eines Verfahrens gemäß Anspruch 16 oder 17 gefunden werden.
23. Insektizid und/oder akarizid wirksame Substanzen, die mittels eines Verfahrens gemäß Anspruch 16 oder 17 gefunden werden.

Fig. 1b

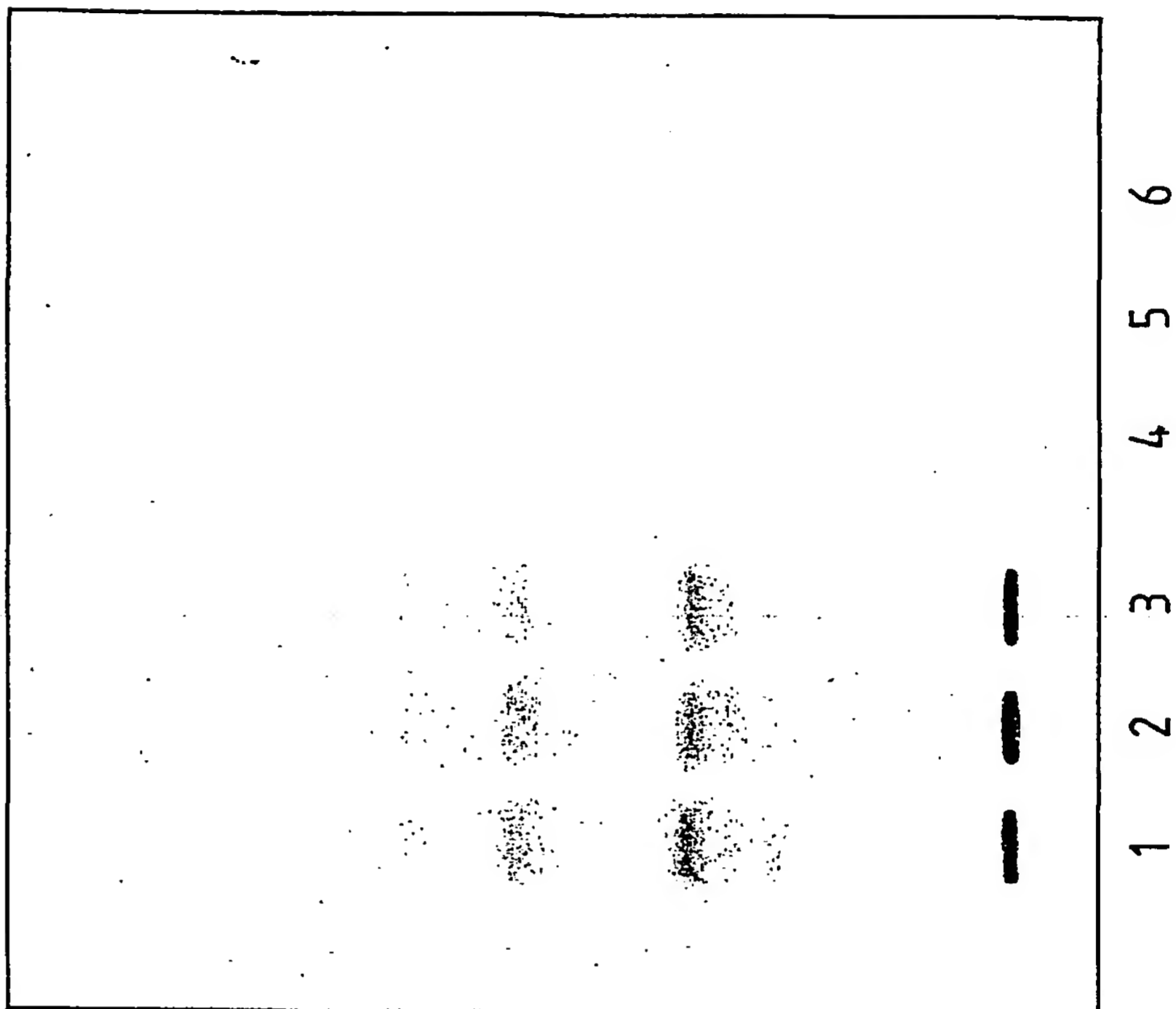
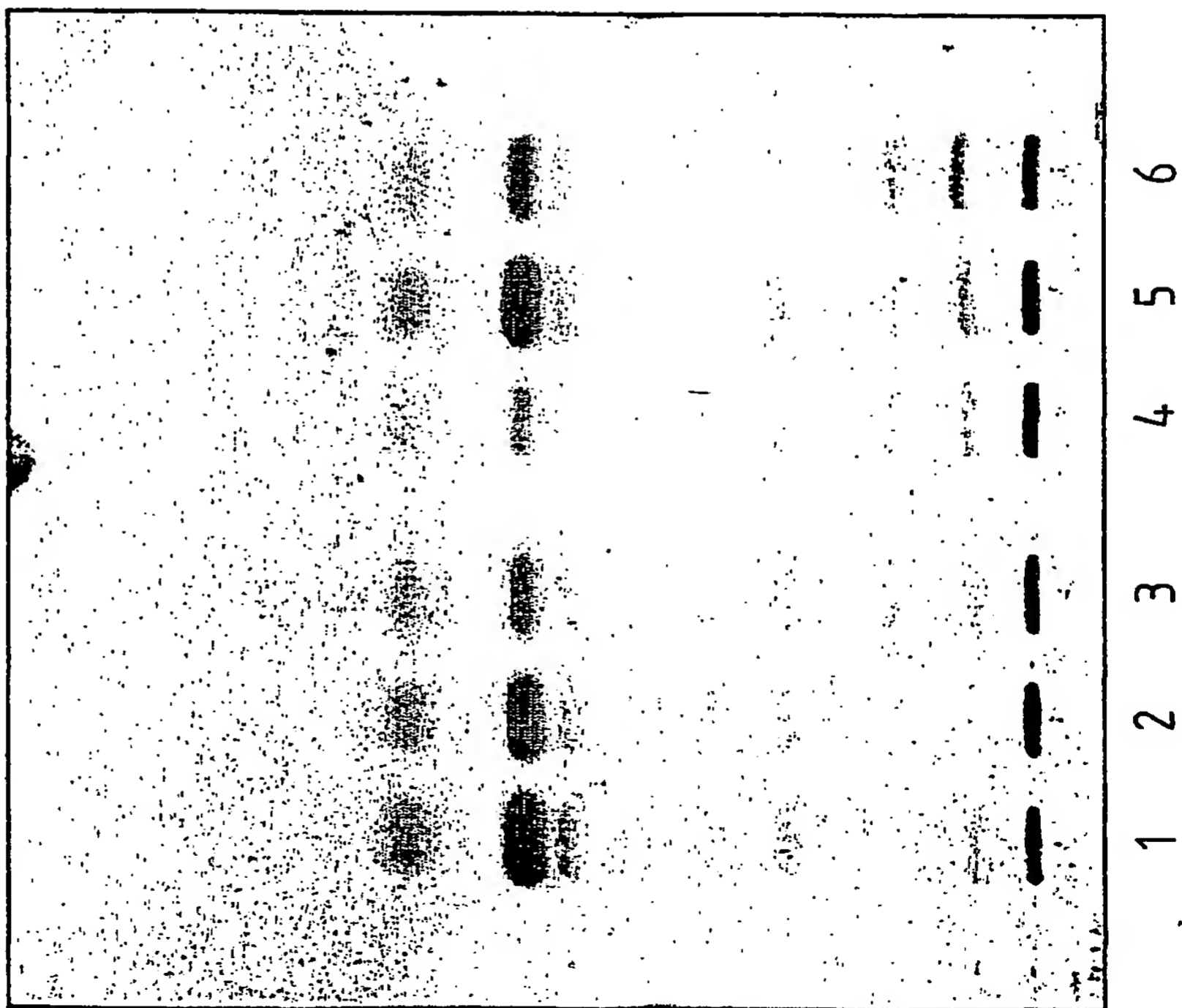


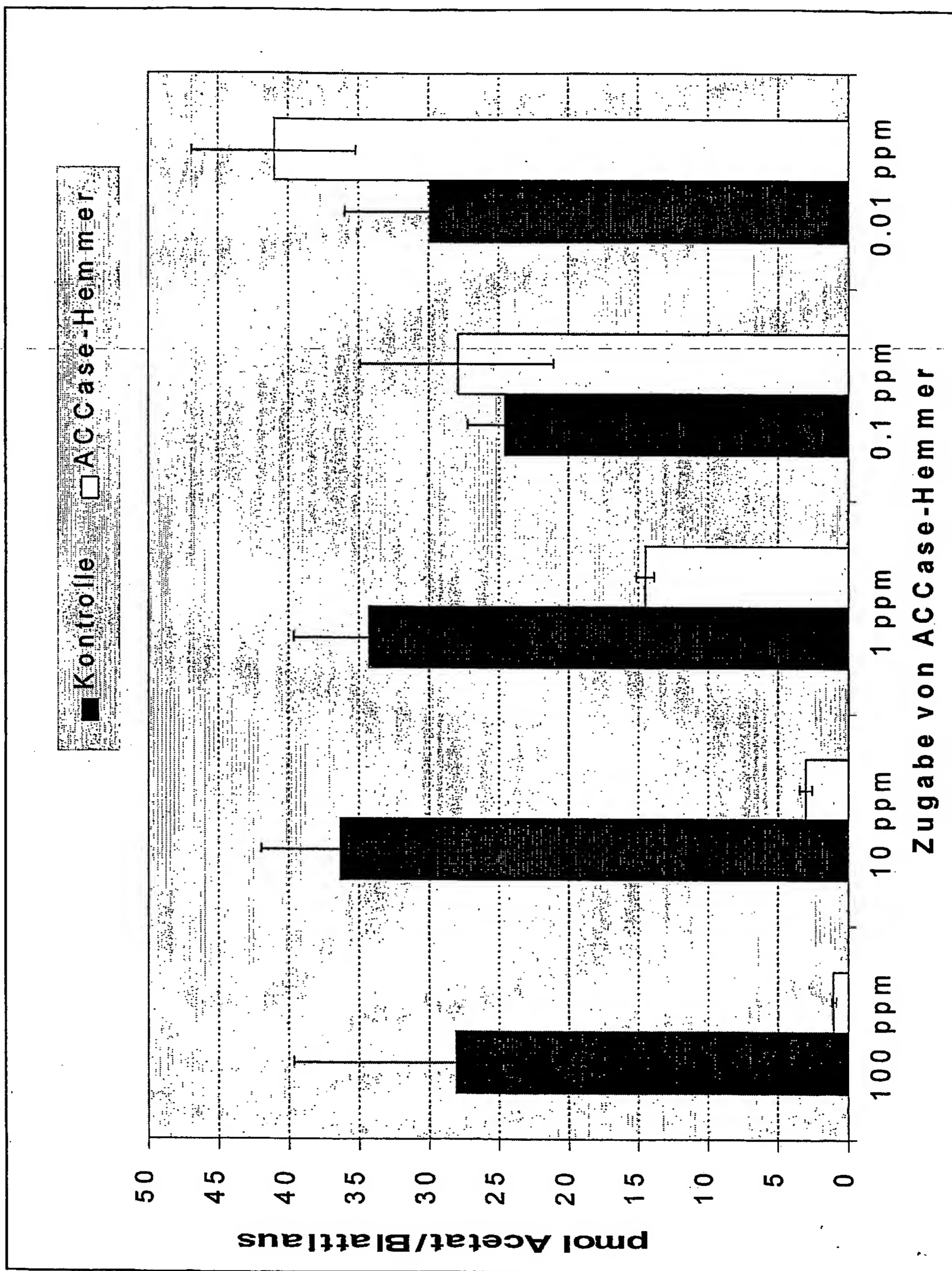
Fig. 1a



BEST AVAILABLE COPY

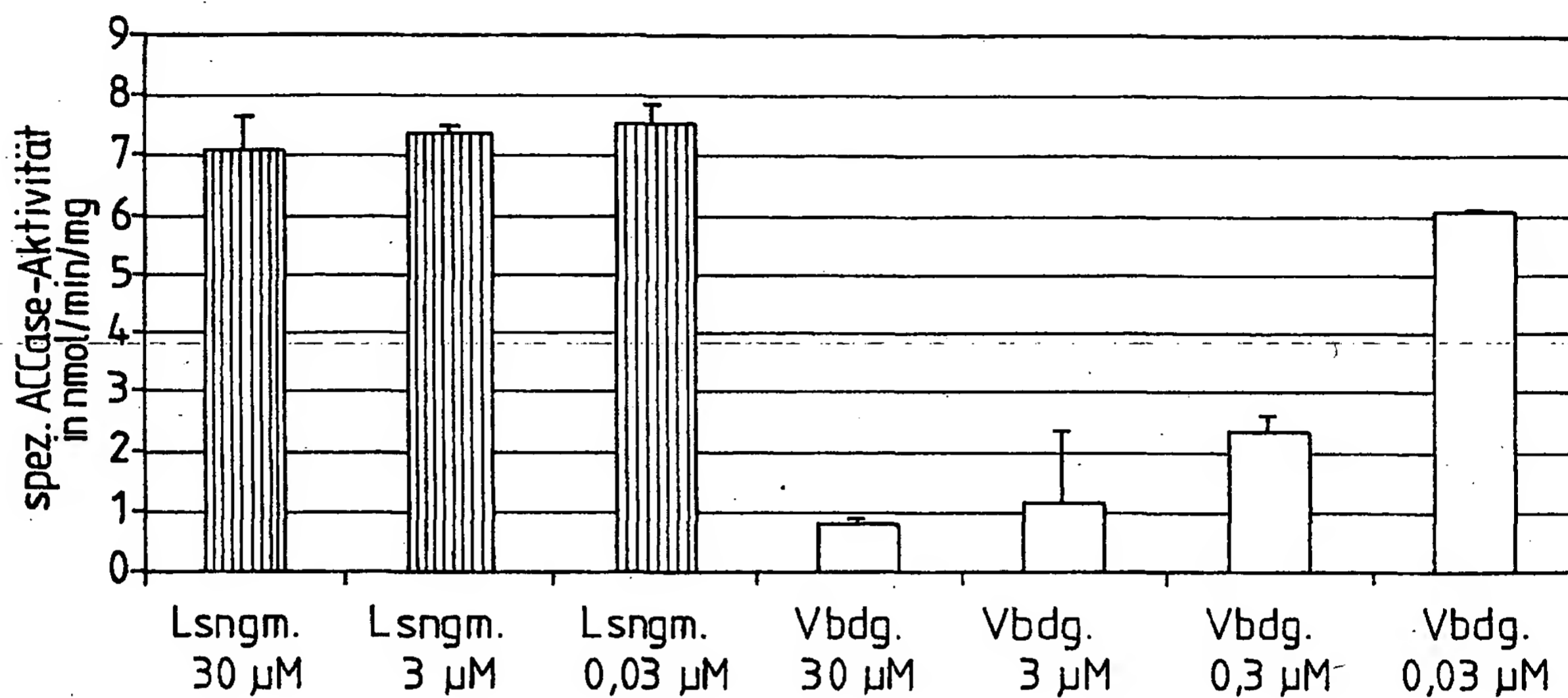
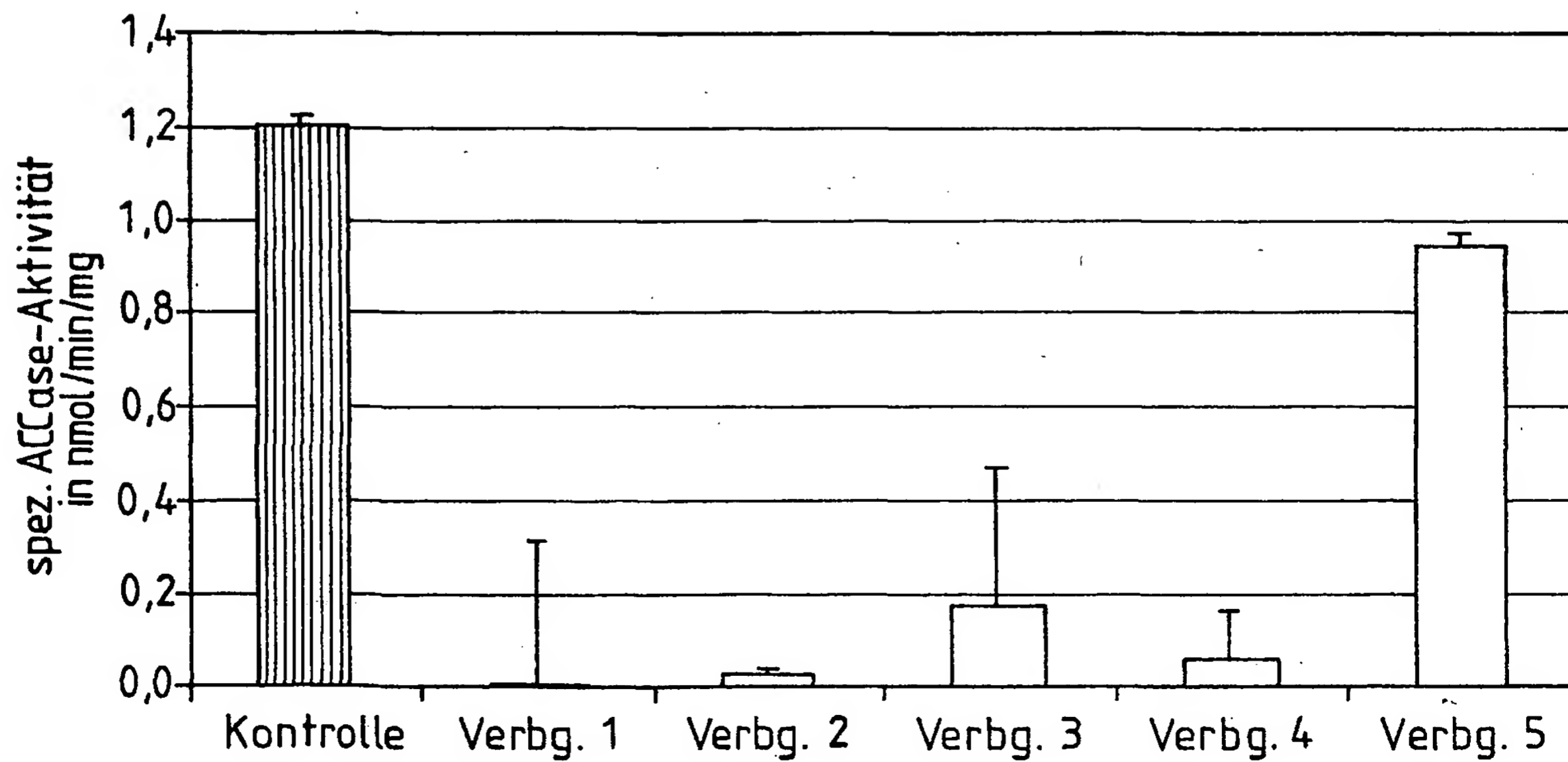
ERSATZBLATT (REGEL 26)

Abbildung 1c



BEST AVAILABLE COPY

ERSATZBLATT (REGEL 26)

**Fig. 2a****Fig. 2b****BEST AVAILABLE COPY**

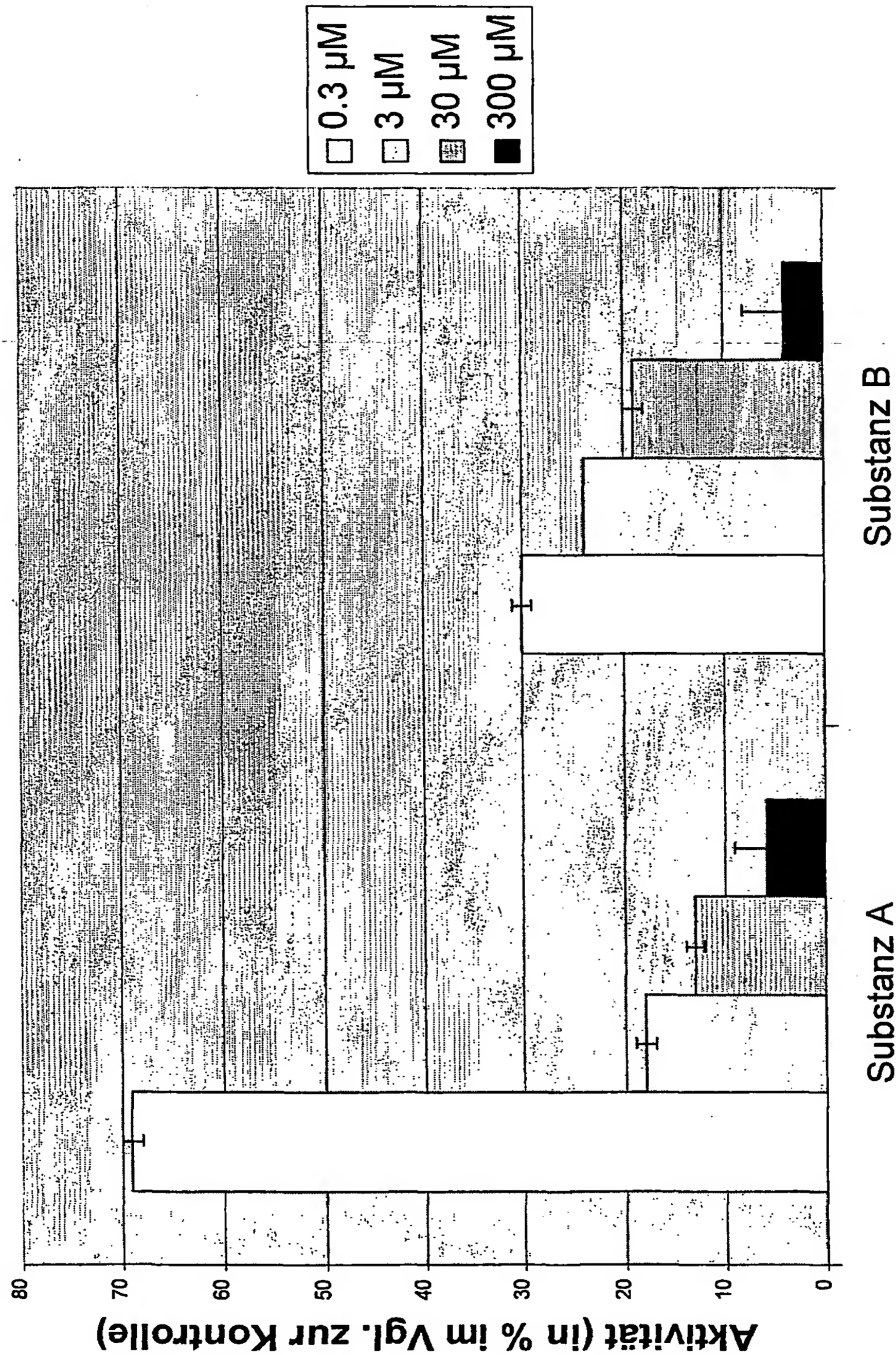


Abbildung 3

BEST AVAILABLE COPY

- 1 -

## SEQUENZPROTOKOLL

&lt;110&gt; Bayer AG

<120> Verwendung von Acetyl-CoA Carboxylase zum  
Identifizieren von insektiziden Wirkstoffen.

&lt;130&gt; Le A 35 035

&lt;140&gt;

&lt;141&gt;

&lt;160&gt; 2

&lt;170&gt; PatentIn Ver. 2.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 7047

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Drosophila melanogaster

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(7047)

&lt;400&gt; 1

atg ttg aag cgt cgc gcc agc aag cgt ttc gta ctt gtt gag tcc ggt	48
Met Leu Lys Arg Arg Ala Ser Lys Arg Phe Val Leu Val Glu Ser Gly	
1 5 10 15	
 gaa gat aat gcc aac ggc tcc ggc tcg gcc tcg ggc tct ggc tcg gga	96
Glu Asp Asn Ala Asn Gly Ser Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly Ser Gly	
20 25 30	
 tca gga gtg gga acg gcg gtt ata ccc caa ttt gtg gct gtg gat tgc	144
Ser Gly Val Gly Thr Ala Val Ile Pro Gln Phe Val Ala Val Asp Cys	
35 40 45	
 ggg cag aac gag agc aac aac aac cat gtc ggc gag atg agt gcc agc	192
Gly Gln Asn Glu Ser Asn Asn Asn His Val Gly Glu Met Ser Ala Ser	
50 55 60	
 atc agc aat cac aat agc tcc aac aac cag tcg tcg cca tcg ctg ctc	240
Ile Ser Asn His Asn Ser Ser Asn Asn Gln Ser Ser Pro Ser Leu Leu	
65 70 75 80	
 agt gtg ccc gtg gtg gga acc ctc aag ccg agt atg tcg cgt ggc aca	288
Ser Val Pro Val Val Gly Thr Leu Lys Pro Ser Met Ser Arg Gly Thr	
85 90 95	
 ggg ctg ggc cag gac cgg cac cag gat cgc gac ttc cac atc gca acc	336
Gly Leu Gly Gln Asp Arg His Gln Asp Arg Asp Phe His Ile Ala Thr	
100 105 110	
 acc gag gag ttc gtg aag cgc ttt ggc ggc acc cga gtg atc aac aag	384
Thr Glu Glu Phe Val Lys Arg Phe Gly Gly Thr Arg Val Ile Asn Lys	
115 120 125	
 gtc ctg att gcc aac aac ggt atc gcg gcc gtc aag tgc atg cga tcc	432
Val Leu Ile Ala Asn Asn Gly Ile Ala Ala Val Lys Cys Met Arg Ser	
130 135 140	

BEST AVAILABLE COPY

- 2 -

atc	cgg	aga	tgg	gcg	tac	gaa	atg	ttt	aag	aac	gag	cgg	gcc	att	agg	480
Ile	Arg	Arg	Trp	Ala	Tyr	Glu	Met	Phe	Lys	Asn	Glu	Arg	Ala	Ile	Arg	
145					150					155					160	
ttt	gtg	gtg	atg	gtc	act	ccg	gag	gat	cta	aag	gcg	aat	gcc	gaa	tac	528
Phe	Val	Val	Met	Val	Thr	Pro	Glu	Asp	Leu	Lys	Ala	Asn	Ala	Glu	Tyr	
				165					170					175		
atc	aag	atg	gcg	gat	cac	tat	gtg	ccc	gtg	ccc	ggc	gga	tcg	aac	aac	576
Ile	Lys	Met	Ala	Asp	His	Tyr	Val	Pro	Val	Pro	Gly	Gly	Ser	Asn	Asn	
			180					185					190			
aac	aac	tac	gcc	aat	gtc	gag	ctc	atc	gtg	gac	att	gct	ctt	cgc	acc	624
Asn	Asn	Tyr	Ala	Asn	Val	Glu	Leu	Ile	Val	Asp	Ile	Ala	Leu	Arg	Thr	
		195				200					205					
caa	gtg	cag	gcc	gtg	tgg	gct	ggg	tgg	ggg	cat	gcc	tcc	gag	aac	ccg	672
Gln	Val	Gln	Ala	Val	Trp	Ala	Gly	Trp	Gly	His	Ala	Ser	Glu	Asn	Pro	
	210					215					220					
aag	ctg	ccg	gag	ctg	ctt	cac	aaa	gag	ggg	ctg	gtg	ttc	ctt	ggc	cct	720
Lys	Leu	Pro	Glu	Leu	Leu	His	Lys	Glu	Gly	Leu	Val	Phe	Leu	Gly	Pro	
225				230				235							240	
ccg	gaa	cgt	gcc	atg	tgg	gcg	ctg	ggc	gac	aag	gtg	gcc	tcc	tct	att	768
Pro	Glu	Arg	Ala	Met	Trp	Ala	Leu	Gly	Asp	Lys	Val	Ala	Ser	Ser	Ile	
				245				250						255		
gtg	gcc	caa	acg	gcc	gag	att	ccc	acc	ctg	ccg	tgg	tcc	ggg	tcg	gac	816
Val	Ala	Gln	Thr	Ala	Glu	Ile	Pro	Thr	Leu	Pro	Trp	Ser	Gly	Ser	Asp	
			260				265						270			
ctg	aag	gcc	cag	tac	agt	ggc	aaa	aag	atc	aag	att	tcc	agt	gag	ctc	864
Leu	Lys	Ala	Gln	Tyr	Ser	Gly	Lys	Lys	Ile	Lys	Ile	Ser	Ser	Glu	Leu	
		275				280						285				
ttc	gcc	cga	ggg	tgt	gtg	acc	aat	gtg	gaa	cag	ggg	ctg	gcc	gca	gtt	912
Phe	Ala	Arg	Gly	Cys	Val	Thr	Asn	Val	Glu	Gln	Gly	Leu	Ala	Ala	Val	
	290					295					300					
aac	aag	att	ggc	ttc	ccc	gta	atg	atc	aag	gcc	tcg	gaa	gga	ggg	ggg	960
Asn	Lys	Ile	Gly	Phe	Pro	Val	Met	Ile	Lys	Ala	Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	
305					310					315					320	
ggc	aag	ggg	att	cgc	cgc	gtg	gac	acc	act	gag	gag	ttc	ccc	ggc	ctg	1008
Gly	Lys	Gly	Ile	Arg	Arg	Val	Asp	Thr	Thr	Glu	Glu	Phe	Pro	Gly	Leu	
				325				330						335		
ttc	cgc	cag	gtt	caa	gct	gag	gtg	ccc	ggc	tca	ccg	att	ttc	gtg	atg	1056
Phe	Arg	Gln	Val	Gln	Ala	Glu	Val	Pro	Gly	Ser	Pro	Ile	Phe	Val	Met	
			340					345					350			
aag	ctg	gcc	cgc	gga	gct	cgc	cac	ttg	gag	gtg	caa	ctg	ttg	gca	gat	1104
Lys	Leu	Ala	Arg	Gly	Ala	Arg	His	Leu	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Ala	Asp	
		355					360					365				
cag	tac	ggc	aat	gcc	att	agc	ttg	ttc	ggc	cgt	gac	tgc	tcc	atc	cag	1152
Gln	Tyr	Gly	Asn	Ala	Ile	Ser	Leu	Phe	Gly	Arg	Asp	Cys	Ser	Ile	Gln	
	370					375				380						
cgt	cgt	cat	cag	aaa	att	att	gag	gaa	gct	cct	gcc	atc	gtg	gcc	cag	1200
Arg	Arg	His	Gln	Lys	Ile	Ile	Glu	Glu	Ala	Pro	Ala	Ile	Val	Ala	Gln	

- 3 -

385	390	395	400	
cca gag gtg ttc gag gag atg gag aag gcc gcc gtg cgg ttg gcc aag	Pro Glu Val Phe Glu Asp Met Glu Lys Ala Ala Val Arg Leu Ala Lys	1248		
	405	410	415	
atg gtg ggt tac gtc agc gcg gga acc gtg gag tac cta tat gat ccg	Met Val Gly Tyr Val Ser Ala Gly Thr Val Glu Tyr Leu Tyr Asp Pro	1296		
	420	425	430	
gag ggt cgc tac ttc ttc ctg gag ctg aac cca cgt ttg cag gtg gag	Glu Gly Arg Tyr Phe Phe Leu Glu Leu Asn Pro Arg Leu Gln Val Glu	1344		
	435	440	445	
cat ccg tgt acg gag atg gtg gcc gat gta aat ctt cca gct gct cag	His Pro Cys Thr Glu Met Val Ala Asp Val Asn Leu Pro Ala Ala Gln	1392		
	450	455	460	
ctg cag att gga atg gga att ccc ctt tac cgg ctc aag gac atc cgt	Leu Gln Ile Gly Met Gly Ile Pro Leu Tyr Arg Leu Lys Asp Ile Arg	1440		
	465	470	475	480
ctg ctg tac gga gag tct ccc tgg ggc tcc tca gtc att gac ttc gaa	Leu Leu Tyr Gly Glu Ser Pro Trp Gly Ser Ser Val Ile Asp Phe Glu	1488		
	485	490	495	
aat cca ccg aac aaa ccg cgt ccc tcc gga cat gtt atc gct gct cgt	Asn Pro Pro Asn Lys Pro Arg Pro Ser Gly His Val Ile Ala Ala Arg	1536		
	500	505	510	
atc acc tca gag aac ccc gac gag ggc ttt aag ccc agt tct gga acc	Ile Thr Ser Glu Asn Pro Asp Glu Gly Phe Lys Pro Ser Ser Gly Thr	1584		
	515	520	525	
gtt cag gag ctt aac ttc cgg tcg agc aaa aat gtg tgg ggc tac ttc	Val Gln Glu Leu Asn Phe Arg Ser Ser Lys Asn Val Trp Gly Tyr Phe	1632		
	530	535	540	
agt gtg gct gcc agt gga gga ttg cac gag ttc gcg gat tca cag ttt	Ser Val Ala Ala Ser Gly Gly Leu His Glu Phe Ala Asp Ser Gln Phe	1680		
	545	550	555	560
ggg cat tgt ttc tcc tgg ggc gag aac cgt caa cag gct cga gag aac	Gly His Cys Phe Ser Trp Gly Glu Asn Arg Gln Gln Ala Arg Glu Asn	1728		
	565	570	575	
ctg gtg att gcc ctg aag gag ctg tca att cga ggt gat ttc cga acc	Leu Val Ile Ala Leu Lys Glu Leu Ser Ile Arg Gly Asp Phe Arg Thr	1776		
	580	585	590	
aca gtg gaa tac ttg atc act ctg ctc gaa acg aat cgg ttc ctc gac	Thr Val Glu Tyr Leu Ile Thr Leu Leu Glu Thr Asn Arg Phe Leu Asp	1824		
	595	600	605	
aac agc atc gac acc gcc tgg cta gat gcc ttg atc gca gag cgt gtg	Asn Ser Ile Asp Thr Ala Trp Leu Asp Ala Leu Ile Ala Glu Arg Val	1872		
	610	615	620	
caa tcc gag aag ccg gat atc ctg ttg ggc gta atg tgc gga tcg ctg	Gln Ser Glu Lys Pro Asp Ile Leu Leu Gly Val Met Cys Gly Ser Leu	1920		
	625	630	635	640

- 4 -

cac atc gca gat cgt caa att act gag agc ttt tcc agc ttc caa acc	1968
His Ile Ala Asp Arg Gln Ile Thr Glu Ser Phe Ser Ser Phe Gln Thr	
645 650 655	
tct ctg gag aaa ggt cag atc caa gca gcg aac acg ctg acg aac gtg	2016
Ser Leu Glu Lys Gly Gln Ile Gln Ala Ala Asn Thr Leu Thr Asn Val	
660 665 670	
gtg gat gtt gag cta atc aac gat ggc atc cgt tac aag gtg cag gcc	2064
Val Asp Val Glu Leu Ile Asn Asp Gly Ile Arg Tyr Lys Val Gln Ala	
675 680 685	
gcc aag agc gga gcc aac tcg tac ttc ctg ctg atg aac agc tcg ttt	2112
Ala Lys Ser Gly Ala Asn Ser Tyr Phe Leu Leu Met Asn Ser Ser Phe	
690 695 700	
aag gag atc gag gtg cac cgc ctc tcc gac gga ggc ttg ctc atc tct	2160
Lys Glu Ile Glu Val His Arg Leu Ser Asp Gly Gly Leu Leu Ile Ser	
705 710 715 720	
ttg gag ggc gcc tcc tac acc acg tac atg aag gag gag gtg gat cgc	2208
Leu Glu Gly Ala Ser Tyr Thr Thr Tyr Met Lys Glu Glu Val Asp Arg	
725 730 735	
tac cgc att gtg att ggc aac cag aca tgt gtc ttt gaa aag gag aac	2256
Tyr Arg Ile Val Ile Gly Asn Gln Thr Cys Val Phe Glu Lys Glu Asn	
740 745 750	
gat cca tcg ctg ttg cgc agt ccg tct gcg gga aag ctc atc aac atg	2304
Asp Pro Ser Leu Leu Arg Ser Pro Ser Ala Gly Lys Leu Ile Asn Met	
755 760 765	
att gtg gaa gat ggc gct cat gta agc aag ggc cag gcc tat gct gag	2352
Ile Val Glu Asp Gly Ala His Val Ser Lys Gly Gln Ala Tyr Ala Glu	
770 775 780	
att gag gtg atg aag atg gtg atg acc ctg acg tcc cag gag gca ggc	2400
Ile Glu Val Met Lys Met Val Met Thr Leu Thr Ser Gln Glu Ala Gly	
785 790 795 800	
aca gtg aca ttt gtg cgt cga cca gga gct gtt cta gat gca gga tcc	2448
Thr Val Thr Phe Val Arg Arg Pro Gly Ala Val Leu Asp Ala Gly Ser	
805 810 815	
ctt ttg ggc cac ttg gag ctg gac gat cca tcg ctg gtg acg aaa gcg	2496
Leu Leu Gly His Leu Glu Leu Asp Asp Pro Ser Leu Val Thr Lys Ala	
820 825 830	
cag ccc ttc aag gga cag ttc ctg cag cca gag aac gca ccg gta ccc	2544
Gln Pro Phe Lys Gly Gln Phe Leu Gln Pro Glu Asn Ala Pro Val Pro	
835 840 845	
gag aaa cta aac agg gtg cac aat act tac aag agt atc ctt gaa aac	2592
Glu Lys Leu Asn Arg Val His Asn Thr Tyr Lys Ser Ile Leu Glu Asn	
850 855 860	
aca ctg gct ggt tac tgc ctg cca gaa ccg ttc aat gca cag cga ctc	2640
Thr Leu Ala Gly Tyr Cys Leu Pro Glu Pro Phe Asn Ala Gln Arg Leu	
865 870 875 880	
aga gac atc atc gaa aaa ttc atg caa agc ttg cgt gat ccc tcg ttg	2688
Arg Asp Ile Ile Glu Lys Phe Met Gln Ser Leu Arg Asp Pro Ser Leu	

- 5 -

885								890					895					
ccg	ttg	ttg	gag	ctg	caa	gaa	gtt	atc	gcc	tcc	atc	tct	ggt	cgc	ata	2736		
Pro	Leu	Leu	Glu	Leu	Gln	Glu	Val	Ile	Ala	Ser	Ile	Ser	Gly	Arg	Ile			
			900					905					910					
ccc	ata	tcc	gtg	gag	aag	aag	atc	cgg	aaa	ctg	atg	acg	ctg	tac	gag	2784		
Pro	Ile	Ser	Val	Glu	Lys	Lys	Ile	Arg	Lys	Leu	Met	Thr	Leu	Tyr	Glu			
		915					920					925						
cga	aac	ata	act	agt	gtc	ctg	gcc	caa	ttc	ccc	tcg	cag	cag	atc	gcc	2832		
Arg	Asn	Ile	Thr	Ser	Val	Leu	Ala	Gln	Phe	Pro	Ser	Gln	Gln	Ile	Ala			
	930					935					940							
agt	gtt	att	gac	agc	cat	gcg	gcc	acg	ctg	cag	aag	cgc	gct	gac	cgt	2880		
Ser	Val	Ile	Asp	Ser	His	Ala	Ala	Thr	Leu	Gln	Lys	Arg	Ala	Asp	Arg			
945					950					955					960			
gat	gtc	ttc	ttc	ctg	acc	acc	cag	agc	att	gtg	cag	ctg	gtg	cag	cgc	2928		
Asp	Val	Phe	Phe	Leu	Thr	Thr	Gln	Ser	Ile	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Arg			
				965				970						975				
tat	agg	aac	gga	atc	cgc	ggc	aga	atg	aag	gcc	gcc	gtt	cat	gag	ctg	2976		
Tyr	Arg	Asn	Gly	Ile	Arg	Gly	Arg	Met	Lys	Ala	Ala	Val	His	Glu	Leu			
			980				985						990					
ttg	cgt	cag	tac	tac	gat	gta	gag	tcg	cag	ttc	cag	tat	gga	cac	tac	3024		
Leu	Arg	Gln	Tyr	Tyr	Asp	Val	Glu	Ser	Gln	Phe	Gln	Tyr	Gly	His	Tyr			
		995				1000					1005							
gac	aaa	tgc	gtg	gga	ctg	gtg	cga	gag	cac	aac	aag	gac	gac	atg	cag	3072		
Asp	Lys	Cys	Val	Gly	Leu	Val	Arg	Glu	His	Asn	Lys	Asp	Asp	Met	Gln			
	1010				1015					1020								
acg	gtg	gtc	aac	acc	atc	ttc	tcg	cac	tct	cag	gtg	gcc	aag	aag	aat	3120		
Thr	Val	Val	Asn	Thr	Ile	Phe	Ser	His	Ser	Gln	Val	Ala	Lys	Lys	Asn			
1025				1030				1035						1040				
ctg	ctg	gtc	act	ctg	ctc	att	gat	cac	ctg	tgg	gcc	aac	gaa	cct	gga	3168		
Leu	Leu	Val	Thr	Leu	Leu	Ile	Asp	His	Leu	Trp	Ala	Asn	Glu	Pro	Gly			
			1045				1050						1055					
cta	acg	gac	gaa	ttg	gcc	aac	acg	cta	agt	gaa	ttg	acc	tct	ttg	aat	3216		
Leu	Thr	Asp	Glu	Leu	Ala	Asn	Thr	Leu	Ser	Glu	Leu	Thr	Ser	Leu	Asn			
		1060					1065					1070						
cga	gct	gag	cac	tct	agg	gtt	gcc	ctg	cgg	tcc	cgc	caa	gtt	ctg	atc	3264		
Arg	Ala	Glu	His	Ser	Arg	Val	Ala	Leu	Arg	Ser	Arg	Gln	Val	Leu	Ile			
	1075					1080					1085							
gct	gcc	cac	cag	ccg	gct	tat	gag	ctg	cgc	cac	aac	caa	atg	gag	tcg	3312		
Ala	Ala	His	Gln	Pro	Ala	Tyr	Glu	Leu	Arg	His	Asn	Gln	Met	Glu	Ser			
	1090				1095					1100								
atc	ttt	ctc	tcc	gcc	gtt	gac	atg	tac	ggt	cat	gac	ttc	cac	ccc	gag	3360		
Ile	Phe	Leu	Ser	Ala	Val	Asp	Met	Tyr	Gly	His	Asp	Phe	His	Pro	Glu			
1105				1110				1115						1120				
aac	ctg	cag	cgc	ctg	att	ctg	tcg	gag	acc	tca	atc	ttt	gac	atc	ctg	3408		
Asn	Leu	Gln	Arg	Leu	Ile	Leu	Ser	Glu	Thr	Ser	Ile	Phe	Asp	Ile	Leu			
			1125				1130						1135					

- 6 -

cac gac ttc ttc tac cac tct aac cgg gca gtg tgc aat gct gct ctg	3456
His Asp Phe Phe Tyr His Ser Asn Arg Ala Val Cys Asn Ala Ala Leu	
1140 1145 1150	
gaa gtc tat gtg agg aga gct tac aca tcc tat gag ctg acc tgc ttg	3504
Glu Val Tyr Val Arg Arg Ala Tyr Thr Ser Tyr Glu Leu Thr Cys Leu	
1155 1160 1165	
cag cat ttg gaa ctc tcc ggt ggc ctg ccg ctg gtg cac ttc cag ttc	3552
Gln His Leu Glu Leu Ser Gly Gly Leu Pro Leu Val His Phe Gln Phe	
1170 1175 1180	
ctc ctc ccc aca gct cac ccg aac aga ctg ttc tcg cgc atg tcc tcc	3600
Leu Leu Pro Thr Ala His Pro Asn Arg Leu Phe Ser Arg Met Ser Ser	
1185 1190 1195 1200	
ccc gat gga ttg gat cag gca gcg gca gag tct ttg gga aac tca ttc	3648
Pro Asp Gly Leu Asp Gln Ala Ala Ala Glu Ser Leu Gly Asn Ser Phe	
1205 1210 1215	
gtg cgc acc gga gcg att gca gcc ttt gac tcc ttc gaa cac ttt gag	3696
Val Arg Thr Gly Ala Ile Ala Ala Phe Asp Ser Phe Glu His Phe Glu	
1220 1225 1230	
atg tac tcg gac gag att ctg gat ctg ctc gaa gac ttc gtc tcg cca	3744
Met Tyr Ser Asp Glu Ile Leu Asp Leu Leu Glu Asp Phe Val Ser Pro	
1235 1240 1245	
gcc atg gtt aat gcc aag gtc ctg gaa gcc gta gag gca gcg gat tct	3792
Ala Met Val Asn Ala Lys Val Leu Glu Ala Val Glu Ala Ala Asp Ser	
1250 1255 1260	
atc tcg gac agc cga cac agc acc tcg atc aat gtg tcg ttg tcg gat	3840
Ile Ser Asp Ser Arg His Ser Thr Ser Ile Asn Val Ser Leu Ser Asp	
1265 1270 1275 1280	
ccc gta acc cgg gcg aat gct gcc gag gag gcc aag tcc acc gaa ccg	3888
Pro Val Thr Arg Ala Asn Ala Ala Glu Glu Ala Lys Ser Thr Glu Pro	
1285 1290 1295	
att cac att gtt agt gtg gct gtg aga gaa acg ggg gag ttg gat gac	3936
Ile His Ile Val Ser Val Ala Val Arg Glu Thr Gly Glu Leu Asp Asp	
1300 1305 1310	
ctg caa atg gcc caa atc ttt gga aat tat tgc caa gag cat aac gag	3984
Leu Gln Met Ala Gln Ile Phe Gly Asn Tyr Cys Gln Glu His Asn Glu	
1315 1320 1325	
gag ctc ttc cag cga cgc att cgt agg att aca ttt gct gct ctg aag	4032
Glu Leu Phe Gln Arg Arg Ile Arg Arg Ile Thr Phe Ala Ala Leu Lys	
1330 1335 1340	
aag cgg caa ttc ccc aag ttc ttt acg ttc aga gcc aga gat aag ttc	4080
Lys Arg Gln Phe Pro Lys Phe Phe Thr Phe Arg Ala Arg Asp Lys Phe	
1345 1350 1355 1360	
acg gag gat cgt att tac cgg cat ctg gag cca gca tct gct ttc cat	4128
Thr Glu Asp Arg Ile Tyr Arg His Leu Glu Pro Ala Ser Ala Phe His	
1365 1370 1375	
ctg gag ctg aac cgc atg aag acg tac gat ctg gag gct ctg ccc acg	4176
Leu Glu Leu Asn Arg Met Lys Thr Tyr Asp Leu Glu Ala Leu Pro Thr	

- 7 -

1380	1385	1390	
gct aac caa aag atg cac ctg tac ctt ggc aag gcc aag gtt tcg aaa			4224
Ala Asn Gln Lys Met His Leu Tyr Leu Gly Lys Ala Lys Val Ser Lys			
1395	1400	1405	
ggt caa gag gtc acg gac tac cgc ttc ttc att cgc tcg atc atc cgt			4272
Gly Gln Glu Val Thr Asp Tyr Arg Phe Phe Ile Arg Ser Ile Ile Arg			
1410	1415	1420	
cat tcg gat ctg att acc aag gaa gcc tct ttc gag tat ctg caa aac			4320
His Ser Asp Leu Ile Thr Lys Glu Ala Ser Phe Glu Tyr Leu Gln Asn			
1425	1430	1435	1440
gaa gga gag cgt gtg ctc ctg gag gcc atg gat gag ctg gag gtg gca			4368
Glu Gly Glu Arg Val Leu Leu Glu Ala Met Asp Glu Leu Glu Val Ala			
1445	1450	1455	
ttc tcg cat ccg cac gcc aaa cgc acg gac tgc aac cac atc ttc ctg			4416
Phe Ser His Pro His Ala Lys Arg Thr Asp Cys Asn His Ile Phe Leu			
1460	1465	1470	
aac ttt gtg ccc acc gtc atc atg gat ccg gct aag atc gag gaa tct			4464
Asn Phe Val Pro Thr Val Ile Met Asp Pro Ala Lys Ile Glu Glu Ser			
1475	1480	1485	
gta aca aag atg att atg cga tat ggt cca cgt ctt tgg aag ctg cgt			4512
Val Thr Lys Met Ile Met Arg Tyr Gly Pro Arg Leu Trp Lys Leu Arg			
1490	1495	1500	
gta ctg cag gct gag ctc aag atg gtc atc cgc cag tca cca cag tca			4560
Val Leu Gln Ala Glu Leu Lys Met Val Ile Arg Gln Ser Pro Gln Ser			
1505	1510	1515	1520
ccc act cag gca gtg cgt ctg tgc att gca aat gac tcc ggc tac ttc			4608
Pro Thr Gln Ala Val Arg Leu Cys Ile Ala Asn Asp Ser Gly Tyr Phe			
1525	1530	1535	
ctg gat att tcg atg tat acc gaa caa aca gaa cca gag aca gga atc			4656
Leu Asp Ile Ser Met Tyr Thr Glu Gln Thr Glu Pro Glu Thr Gly Ile			
1540	1545	1550	
att aag ttt aag gcc tac ggt gag aag cag gga tct ctg cac gga cat			4704
Ile Lys Phe Lys Ala Tyr Gly Glu Lys Gln Gly Ser Leu His Gly His			
1555	1560	1565	
ccc att tcg acg ccc tac atg acc aag gac ttc ctg cag cag aaa cgt			4752
Pro Ile Ser Thr Pro Tyr Met Thr Lys Asp Phe Leu Gln Gln Lys Arg			
1570	1575	1580	
ttc cag gcg cag tcc aat ggt acc acc tat gtc tat gat gtg ccc gac			4800
Phe Gln Ala Gln Ser Asn Gly Thr Thr Tyr Val Tyr Asp Val Pro Asp			
1585	1590	1595	1600
atg ttc cgc cag atg acc gag cgt cac tgg aga gaa ttc tcc aag gct			4848
Met Phe Arg Gln Met Thr Glu Arg His Trp Arg Glu Phe Ser Lys Ala			
1605	1610	1615	
cgt ccc acc gtg gac att cgc act ccc gac aag att ttg atc gag tgc			4896
Arg Pro Thr Val Asp Ile Arg Thr Pro Asp Lys Ile Leu Ile Glu Cys			
1620	1625	1630	

- 8 -

aag gag ctg gtc ctc gag ggc gac aac ctt gta gag atg cag cgt ctg Lys Glu Leu Val Leu Glu Gly Asp Asn Leu Val Glu Met Gln Arg Leu 1635 1640 1645	4944
ccc ggc gaa aac aat tgc ggc atg gtg gct tgg cgc att gtc ttg gct Pro Gly Glu Asn Asn Cys Gly Met Val Ala Trp Arg Ile Val Leu Ala 1650 1655 1660	4992
act ccg gaa tat ccg aat ggc cgc gag atc att gtt ata gcc aac gat Thr Pro Glu Tyr Pro Asn Gly Arg Glu Ile Ile Val Ile Ala Asn Asp 1665 1670 1675 1680	5040
ctc acc tac ttg att ggt tcc ttt gga att aag gag gac gtt ctc ttt Leu Thr Tyr Leu Ile Gly Ser Phe Gly Ile Lys Glu Asp Val Leu Phe 1685 1690 1695	5088
gcc aag gct tcc caa ttg gct cgc caa ctc aaa gta ccg agg ata tac Ala Lys Ala Ser Gln Leu Ala Arg Gln Leu Lys Val Pro Arg Ile Tyr 1700 1705 1710	5136
atc tcc gtt aac agc ggt gcc cgc ata gga ctt gct gag gag gtt aaa Ile Ser Val Asn Ser Gly Ala Arg Ile Gly Leu Ala Glu Glu Val Lys 1715 1720 1725	5184
gct atg ttc aag atc gca tgg gag gat cca gag gag cca gat aag ggc Ala Met Phe Lys Ile Ala Trp Glu Asp Pro Glu Glu Pro Asp Lys Gly 1730 1735 1740	5232
ttc aag tac ctc tac ttg agc acc gag gac tac gcc cag gtg gcc aac Phe Lys Tyr Leu Tyr Leu Ser Thr Glu Asp Tyr Ala Gln Val Ala Asn 1745 1750 1755 1760	5280
ctg aac tcg gtg agg gct atc ctg atc gag gac gag ggc gag cag cgt Leu Asn Ser Val Arg Ala Ile Leu Ile Glu Asp Glu Gly Glu Gln Arg 1765 1770 1775	5328
tac aag att acc gac atc atc ggc aag gac gat ggt ctg gcc gtg gag Tyr Lys Ile Thr Asp Ile Ile Gly Lys Asp Asp Gly Leu Gly Val Glu 1780 1785 1790	5376
aat ctg cgt tac gcc ggc ttg att gcc ggt gaa acg tcg cag gcc tac Asn Leu Arg Tyr Ala Gly Leu Ile Ala Gly Glu Thr Ser Gln Ala Tyr 1795 1800 1805	5424
gag gag att gtt act atc gct atg gtt acc tgc cgt acc att gcc att Glu Glu Ile Val Thr Ile Ala Met Val Thr Cys Arg Thr Ile Gly Ile 1810 1815 1820	5472
gga tcc tat gtg gtg cgc ctg ggt cag cgc gtt atc cag atc gat aat Gly Ser Tyr Val Val Arg Leu Gly Gln Arg Val Ile Gln Ile Asp Asn 1825 1830 1835 1840	5520
tca cac att ata ctc act ggc tat gct gcg ctt aac aag ctg ctt gga Ser His Ile Ile Leu Thr Gly Tyr Ala Ala Leu Asn Lys Leu Leu Gly 1845 1850 1855	5568
cgc aag gtg tat gcc tct aat aat cag ttg ggt gcc aca cag atc atg Arg Lys Val Tyr Ala Ser Asn Asn Gln Leu Gly Gly Thr Gln Ile Met 1860 1865 1870	5616
ttt aac aac gga gtc acc cac aaa aca gag gcc atc gac ttg gac ggt Phe Asn Asn Gly Val Thr His Lys Thr Glu Ala Ile Asp Leu Asp Gly 5664	

- 9 -

1875	1880	1885	
gtc tac acc atc ctc gac tgg ctc tcg tac atc ccc gcg tac atc ggt Val Tyr Thr Ile Leu Asp Trp Leu Ser Tyr Ile Pro Ala Tyr Ile Gly 1890 1895 1900			5712
tgt gac ctg ccc att gtt ttg ccc aac gat cgt atc gaa cgc cct gtc Cys Asp Leu Pro Ile Val Leu Pro Asn Asp Arg Ile Glu Arg Pro Val 1905 1910 1915 1920			5760
gac ttc atg ccc acc aag tcg ccc tac gat ccg cgc tgg atg ctg ggt Asp Phe Met Pro Thr Lys Ser Pro Tyr Asp Pro Arg Trp Met Leu Gly 1925 1930 1935			5808
ggc cgt gtg aat ccc gtg aac gct aat gac tgg gag aac gga ttc ttt Gly Arg Val Asn Pro Val Asn Ala Asn Asp Trp Glu Asn Gly Phe Phe 1940 1945 1950			5856
gat cgc gac tcg tgg agc gaa atc atg gcc tcg tgg gcc aag aca gtg Asp Arg Asp Ser Trp Ser Glu Ile Met Ala Ser Trp Ala Lys Thr Val 1955 1960 1965			5904
gtc act ggt cgc gca cgt cta ggc ggt gtc ccc gtg ggc gta ata gcc Val Thr Gly Arg Ala Arg Leu Gly Gly Val Pro Val Gly Val Ile Ala 1970 1975 1980			5952
gtt gag acc cgc acc gta gaa gtg gag atg ccc gcc gat cct gcc aat Val Glu Thr Arg Thr Val Glu Val Glu Met Pro Ala Asp Pro Ala Asn 1985 1990 1995 2000			6000
ctc gat tcg gaa gcc aag acc ctg cag cag gca ggt cag gtg tgg tac Leu Asp Ser Glu Ala Lys Thr Leu Gln Gln Ala Gly Gln Val Trp Tyr 2005 2010 2015			6048
ccc gac tcc tcg tac aaa acg gca caa gcg atc aaa gat ttt gga cga Pro Asp Ser Ser Tyr Lys Thr Ala Gln Ala Ile Lys Asp Phe Gly Arg 2020 2025 2030			6096
gag gag ttg ccg ctg att gtt ttc gca aat tgg cga ggc ttc tcc ggt Glu Glu Leu Pro Leu Ile Val Phe Ala Asn Trp Arg Gly Phe Ser Gly 2035 2040 2045			6144
ggc atg aag gac atg tac gag caa atc gtc aag ttc gga gca tac att Gly Met Lys Asp Met Tyr Glu Gln Ile Val Lys Phe Gly Ala Tyr Ile 2050 2055 2060			6192
gtc gac ggc ctg cgg gag tac aag aag cct gtg ctc atc tac ctg ccg Val Asp Gly Leu Arg Glu Tyr Lys Lys Pro Val Leu Ile Tyr Leu Pro 2065 2070 2075 2080			6240
ccc aac gcc gag ctg cga ggt gga gcc tgg gcc gtg ttg gat tcc ctc Pro Asn Ala Glu Leu Arg Gly Gly Ala Trp Ala Val Leu Asp Ser Leu 2085 2090 2095			6288
att aac ccg cgc tac atg gaa acg tat gcc gat ccg gag gcc aga gga Ile Asn Pro Arg Tyr Met Glu Thr Tyr Ala Asp Pro Glu Ala Arg Gly 2100 2105 2110			6336
gga gtt ctc gag ccg gag ggc att gtg gaa ata aag tac aaa gag aag Gly Val Leu Glu Pro Glu Gly Ile Val Glu Ile Lys Tyr Lys Glu Lys 2115 2120 2125			6384

- 10 -

gac ctg gtc aag acg att cac cgc ttg gat ccg acc acc att gcg ctg 6432  
 Asp Leu Val Lys Thr Ile His Arg Leu Asp Pro Thr Thr Ile Ala Leu  
 2130 2135 2140

aaa aag gag ctc gat gag gca aat gcg tct ggc gac aag gtc agg gct 6480  
 Lys Lys Glu Leu Asp Glu Ala Asn Ala Ser Gly Asp Lys Val Arg Ala  
 2145 2150 2155 2160

gct cag gtg gac gaa aag atc aag gcc cgc atc gct gtg cta atg cac 6528  
 Ala Gln Val Asp Glu Lys Ile Lys Ala Arg Ile Ala Val Leu Met His  
 2165 2170 2175

gtc tac cac acg gta gca gtt cac ttt gcc gac ctg cac gac acg ccg 6576  
 Val Tyr His Thr Val Ala Val His Phe Ala Asp Leu His Asp Thr Pro  
 2180 2185 2190

gag cga atg cta gag aag gag tgt atc agt gag att gtg cct tgg cgc 6624  
 Glu Arg Met Leu Glu Lys Glu Cys Ile Ser Glu Ile Val Pro Trp Arg  
 2195 2200 2205

gat tcc cgc cgc tgg ctg tac tgg cgt ctg cga cgt ctc ctg ttg gag 6672  
 Asp Ser Arg Arg Trp Leu Tyr Trp Arg Leu Arg Arg Leu Leu Leu Glu  
 2210 2215 2220

gac gca tat att aag aag atc ctg cgc gct cag gac aac ctc tcc gtg 6720  
 Asp Ala Tyr Ile Lys Lys Ile Leu Arg Ala Gln Asp Asn Leu Ser Val  
 2225 2230 2235 2240

ggt cag gcc aag cag atg ctg cgt cga tgg ctg gta gag gag aag ggt 6768  
 Gly Gln Ala Lys Gln Met Leu Arg Arg Trp Leu Val Glu Glu Lys Gly  
 2245 2250 2255

gcc aca gag gct tat ctg tgg gac aaa aac gag gag atg gtg tct tgg 6816  
 Ala Thr Glu Ala Tyr Leu Trp Asp Lys Asn Glu Glu Met Val Ser Trp  
 2260 2265 2270

tat gag gag cag atc aat gcc gaa tct att gtt tcc cgc aac gtg aac 6864  
 Tyr Glu Glu Gln Ile Asn Ala Glu Ser Ile Val Ser Arg Asn Val Asn  
 2275 2280 2285

tcc gtg aga cgg gat gcc att att tct acc att tcg aaa atg ctc gag 6912  
 Ser Val Arg Arg Asp Ala Ile Ile Ser Thr Ile Ser Lys Met Leu Glu  
 2290 2295 2300

gac tgt ccc gac gta gcg ctg gac gct gtt gtg ggt ctt tgc caa ggt 6960  
 Asp Cys Pro Asp Val Ala Leu Asp Ala Val Val Gly Leu Cys Gln Gly  
 2305 2310 2315 2320

ctg acg cca gtg aat cga ggc gtg gtc gta cgc aca tta gcc cag atg 7008  
 Leu Thr Pro Val Asn Arg Gly Val Val Val Arg Thr Leu Ala Gln Met  
 2325 2330 2335

cag ctg aat gag gag acc tct aac agc aac cag gga tga 7047  
 Gln Leu Asn Glu Glu Thr Ser Asn Ser Asn Gln Gly  
 2340 2345

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 2348

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Drosophila melanogaster

- 11 -

&lt;400&gt; 2

Met	Leu	Lys	Arg	Arg	Ala	Ser	Lys	Arg	Phe	Val	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	1	5	10	15
Glu	Asp	Asn	Ala	Asn	Gly	Ser	Gly	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	20	25	30	
Ser	Gly	Val	Gly	Thr	Ala	Val	Ile	Pro	Gln	Phe	Val	Ala	Val	Asp	Cys	35	40	45	
Gly	Gln	Asn	Glu	Ser	Asn	Asn	Asn	His	Val	Gly	Glu	Met	Ser	Ala	Ser	50	55	60	
Ile	Ser	Asn	His	Asn	Ser	Ser	Asn	Asn	Gln	Ser	Ser	Pro	Ser	Leu	Leu	65	70	75	80
Ser	Val	Pro	Val	Val	Gly	Thr	Leu	Lys	Pro	Ser	Met	Ser	Arg	Gly	Thr	85	90	95	
Gly	Leu	Gly	Gln	Asp	Arg	His	Gln	Asp	Arg	Asp	Phe	His	Ile	Ala	Thr	100	105	110	
Thr	Glu	Glu	Phe	Val	Lys	Arg	Phe	Gly	Gly	Thr	Arg	Val	Ile	Asn	Lys	115	120	125	
Val	Leu	Ile	Ala	Asn	Asn	Gly	Ile	Ala	Ala	Val	Lys	Cys	Met	Arg	Ser	130	135	140	
Ile	Arg	Arg	Trp	Ala	Tyr	Glu	Met	Phe	Lys	Asn	Glu	Arg	Ala	Ile	Arg	145	150	155	160
Phe	Val	Val	Met	Val	Thr	Pro	Glu	Asp	Leu	Lys	Ala	Asn	Ala	Glu	Tyr	165	170	175	
Ile	Lys	Met	Ala	Asp	His	Tyr	Val	Pro	Val	Pro	Gly	Gly	Ser	Asn	Asn	180	185	190	
Asn	Asn	Tyr	Ala	Asn	Val	Glu	Leu	Ile	Val	Asp	Ile	Ala	Leu	Arg	Thr	195	200	205	
Gln	Val	Gln	Ala	Val	Trp	Ala	Gly	Trp	Gly	His	Ala	Ser	Glu	Asn	Pro	210	215	220	
Lys	Leu	Pro	Glu	Leu	Leu	His	Lys	Glu	Gly	Leu	Val	Phe	Leu	Gly	Pro	225	230	235	240
Pro	Glu	Arg	Ala	Met	Trp	Ala	Leu	Gly	Asp	Lys	Val	Ala	Ser	Ser	Ile	245	250	255	
Val	Ala	Gln	Thr	Ala	Glu	Ile	Pro	Thr	Leu	Pro	Trp	Ser	Gly	Ser	Asp	260	265	270	
Leu	Lys	Ala	Gln	Tyr	Ser	Gly	Lys	Lys	Ile	Lys	Ile	Ser	Ser	Glu	Leu	275	280	285	
Phe	Ala	Arg	Gly	Cys	Val	Thr	Asn	Val	Glu	Gln	Gly	Leu	Ala	Ala	Val	290	295	300	
Asn	Lys	Ile	Gly	Phe	Pro	Val	Met	Ile	Lys	Ala	Ser	Glu	Gly	Gly	Gly	305	310	315	320
Gly	Lys	Gly	Ile	Arg	Arg	Val	Asp	Thr	Thr	Glu	Glu	Phe	Pro	Gly	Leu				

- 12 -

325								330				335			
Phe	Arg	Gln	Val	Gln	Ala	Glu	Val	Pro	Gly	Ser	Pro	Ile	Phe	Val	Met
			340					345					350		
Lys	Leu	Ala	Arg	Gly	Ala	Arg	His	Leu	Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Ala	Asp
		355					360					365			
Gln	Tyr	Gly	Asn	Ala	Ile	Ser	Leu	Phe	Gly	Arg	Asp	Cys	Ser	Ile	Gln
	370					375					380				
Arg	Arg	His	Gln	Lys	Ile	Ile	Glu	Glu	Ala	Pro	Ala	Ile	Val	Ala	Gln
385					390					395					400
Pro	Glu	Val	Phe	Glu	Asp	Met	Glu	Lys	Ala	Ala	Val	Arg	Leu	Ala	Lys
				405					410					415	
Met	Val	Gly	Tyr	Val	Ser	Ala	Gly	Thr	Val	Glu	Tyr	Leu	Tyr	Asp	Pro
			420					425					430		
Glu	Gly	Arg	Tyr	Phe	Phe	Leu	Glu	Leu	Asn	Pro	Arg	Leu	Gln	Val	Glu
		435					440					445			
His	Pro	Cys	Thr	Glu	Met	Val	Ala	Asp	Val	Asn	Leu	Pro	Ala	Ala	Gln
	450					455					460				
Leu	Gln	Ile	Gly	Met	Gly	Ile	Pro	Leu	Tyr	Arg	Leu	Lys	Asp	Ile	Arg
465					470					475					480
Leu	Leu	Tyr	Gly	Glu	Ser	Pro	Trp	Gly	Ser	Ser	Val	Ile	Asp	Phe	Glu
				485					490					495	
Asn	Pro	Pro	Asn	Lys	Pro	Arg	Pro	Ser	Gly	His	Val	Ile	Ala	Ala	Arg
			500					505					510		
Ile	Thr	Ser	Glu	Asn	Pro	Asp	Glu	Gly	Phe	Lys	Pro	Ser	Ser	Gly	Thr
		515					520					525			
Val	Gln	Glu	Leu	Asn	Phe	Arg	Ser	Ser	Lys	Asn	Val	Trp	Gly	Tyr	Phe
	530					535					540				
Ser	Val	Ala	Ala	Ser	Gly	Gly	Leu	His	Glu	Phe	Ala	Asp	Ser	Gln	Phe
545					550					555					560
Gly	His	Cys	Phe	Ser	Trp	Gly	Glu	Asn	Arg	Gln	Gln	Ala	Arg	Glu	Asn
				565					570					575	
Leu	Val	Ile	Ala	Leu	Lys	Glu	Leu	Ser	Ile	Arg	Gly	Asp	Phe	Arg	Thr
			580						585				590		
Thr	Val	Glu	Tyr	Leu	Ile	Thr	Leu	Leu	Glu	Thr	Asn	Arg	Phe	Leu	Asp
		595					600					605			
Asn	Ser	Ile	Asp	Thr	Ala	Trp	Leu	Asp	Ala	Leu	Ile	Ala	Glu	Arg	Val
	610					615					620				
Gln	Ser	Glu	Lys	Pro	Asp	Ile	Leu	Leu	Gly	Val	Met	Cys	Gly	Ser	Leu
625					630					635					640
His	Ile	Ala	Asp	Arg	Gln	Ile	Thr	Glu	Ser	Phe	Ser	Ser	Phe	Gln	Thr
				645					650					655	

Ser	Leu	Glu	Lys	Gly	Gln	Ile	Gln	Ala	Ala	Asn	Thr	Leu	Thr	Asn	Val
			660					665					670		
Val	Asp	Val	Glu	Leu	Ile	Asn	Asp	Gly	Ile	Arg	Tyr	Lys	Val	Gln	Ala
		675					680					685			
Ala	Lys	Ser	Gly	Ala	Asn	Ser	Tyr	Phe	Leu	Leu	Met	Asn	Ser	Ser	Phe
	690					695					700				
Lys	Glu	Ile	Glu	Val	His	Arg	Leu	Ser	Asp	Gly	Gly	Leu	Leu	Ile	Ser
705					710					715					720
Leu	Glu	Gly	Ala	Ser	Tyr	Thr	Thr	Tyr	Met	Lys	Glu	Glu	Val	Asp	Arg
				725					730					735	
Tyr	Arg	Ile	Val	Ile	Gly	Asn	Gln	Thr	Cys	Val	Phe	Glu	Lys	Glu	Asn
			740					745					750		
Asp	Pro	Ser	Leu	Leu	Arg	Ser	Pro	Ser	Ala	Gly	Lys	Leu	Ile	Asn	Met
		755					760					765			
Ile	Val	Glu	Asp	Gly	Ala	His	Val	Ser	Lys	Gly	Gln	Ala	Tyr	Ala	Glu
	770					775					780				
Ile	Glu	Val	Met	Lys	Met	Val	Met	Thr	Leu	Thr	Ser	Gln	Glu	Ala	Gly
785					790					795					800
Thr	Val	Thr	Phe	Val	Arg	Arg	Pro	Gly	Ala	Val	Leu	Asp	Ala	Gly	Ser
				805					810					815	
Leu	Leu	Gly	His	Leu	Glu	Leu	Asp	Asp	Pro	Ser	Leu	Val	Thr	Lys	Ala
			820					825					830		
Gln	Pro	Phe	Lys	Gly	Gln	Phe	Leu	Gln	Pro	Glu	Asn	Ala	Pro	Val	Pro
		835					840					845			
Glu	Lys	Leu	Asn	Arg	Val	His	Asn	Thr	Tyr	Lys	Ser	Ile	Leu	Glu	Asn
	850					855					860				
Thr	Leu	Ala	Gly	Tyr	Cys	Leu	Pro	Glu	Pro	Phe	Asn	Ala	Gln	Arg	Leu
865					870					875					880
Arg	Asp	Ile	Ile	Glu	Lys	Phe	Met	Gln	Ser	Leu	Arg	Asp	Pro	Ser	Leu
				885					890					895	
Pro	Leu	Leu	Glu	Leu	Gln	Glu	Val	Ile	Ala	Ser	Ile	Ser	Gly	Arg	Ile
			900					905					910		
Pro	Ile	Ser	Val	Glu	Lys	Lys	Ile	Arg	Lys	Leu	Met	Thr	Leu	Tyr	Glu
		915					920					925			
Arg	Asn	Ile	Thr	Ser	Val	Leu	Ala	Gln	Phe	Pro	Ser	Gln	Gln	Ile	Ala
	930					935					940				
Ser	Val	Ile	Asp	Ser	His	Ala	Ala	Thr	Leu	Gln	Lys	Arg	Ala	Asp	Arg
945					950					955					960
Asp	Val	Phe	Phe	Leu	Thr	Thr	Gln	Ser	Ile	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Arg
				965					970					975	
Tyr	Arg	Asn	Gly	Ile	Arg	Gly	Arg	Met	Lys	Ala	Ala	Val	His	Glu	Leu
			980					985					990		

- 14 -

Leu Arg Gln Tyr Tyr Asp Val Glu Ser Gln Phe Gln Tyr Gly His Tyr  
 995 1000 1005  
 Asp Lys Cys Val Gly Leu Val Arg Glu His Asn Lys Asp Asp Met Gln  
 1010 1015 1020  
 Thr Val Val Asn Thr Ile Phe Ser His Ser Gln Val Ala Lys Lys Asn  
 025 1030 1035 1040  
 Leu Leu Val Thr Leu Leu Ile Asp His Leu Trp Ala Asn Glu Pro Gly  
 1045 1050 1055  
 Leu Thr Asp Glu Leu Ala Asn Thr Leu Ser Glu Leu Thr Ser Leu Asn  
 1060 1065 1070  
 Arg Ala Glu His Ser Arg Val Ala Leu Arg Ser Arg Gln Val Leu Ile  
 1075 1080 1085  
 Ala Ala His Gln Pro Ala Tyr Glu Leu Arg His Asn Gln Met Glu Ser  
 1090 1095 1100  
 Ile Phe Leu Ser Ala Val Asp Met Tyr Gly His Asp Phe His Pro Glu  
 105 1110 1115 1120  
 Asn Leu Gln Arg Leu Ile Leu Ser Glu Thr Ser Ile Phe Asp Ile Leu  
 1125 1130 1135  
 His Asp Phe Phe Tyr His Ser Asn Arg Ala Val Cys Asn Ala Ala Leu  
 1140 1145 1150  
 Glu Val Tyr Val Arg Arg Ala Tyr Thr Ser Tyr Glu Leu Thr Cys Leu  
 1155 1160 1165  
 Gln His Leu Glu Leu Ser Gly Gly Leu Pro Leu Val His Phe Gln Phe  
 1170 1175 1180  
 Leu Leu Pro Thr Ala His Pro Asn Arg Leu Phe Ser Arg Met Ser Ser  
 185 1190 1195 1200  
 Pro Asp Gly Leu Asp Gln Ala Ala Ala Glu Ser Leu Gly Asn Ser Phe  
 1205 1210 1215  
 Val Arg Thr Gly Ala Ile Ala Ala Phe Asp Ser Phe Glu His Phe Glu  
 1220 1225 1230  
 Met Tyr Ser Asp Glu Ile Leu Asp Leu Leu Glu Asp Phe Val Ser Pro  
 1235 1240 1245  
 Ala Met Val Asn Ala Lys Val Leu Glu Ala Val Glu Ala Ala Asp Ser  
 1250 1255 1260  
 Ile Ser Asp Ser Arg His Ser Thr Ser Ile Asn Val Ser Leu Ser Asp  
 265 1270 1275 1280  
 Pro Val Thr Arg Ala Asn Ala Ala Glu Glu Ala Lys Ser Thr Glu Pro  
 1285 1290 1295  
 Ile His Ile Val Ser Val Ala Val Arg Glu Thr Gly Glu Leu Asp Asp  
 1300 1305 1310  
 Leu Gln Met Ala Gln Ile Phe Gly Asn Tyr Cys Gln Glu His Asn Glu

- 15 -

1315	1320	1325
Glu Leu Phe Gln Arg Arg Ile Arg Arg Ile Thr Phe Ala Ala Leu Lys 1330	1335	1340
Lys Arg Gln Phe Pro Lys Phe Phe Thr Phe Arg Ala Arg Asp Lys Phe 345	1350	1355 1360
Thr Glu Asp Arg Ile Tyr Arg His Leu Glu Pro Ala Ser Ala Phe His 1365	1370	1375
Leu Glu Leu Asn Arg Met Lys Thr Tyr Asp Leu Glu Ala Leu Pro Thr 1380	1385	1390
Ala Asn Gln Lys Met His Leu Tyr Leu Gly Lys Ala Lys Val Ser Lys 1395	1400	1405
Gly Gln Glu Val Thr Asp Tyr Arg Phe Phe Ile Arg Ser Ile Ile Arg 1410	1415	1420
His Ser Asp Leu Ile Thr Lys Glu Ala Ser Phe Glu Tyr Leu Gln Asn 425	1430	1435 1440
Glu Gly Glu Arg Val Leu Leu Glu Ala Met Asp Glu Leu Glu Val Ala 1445	1450	1455
Phe Ser His Pro His Ala Lys Arg Thr Asp Cys Asn His Ile Phe Leu 1460	1465	1470
Asn Phe Val Pro Thr Val Ile Met Asp Pro Ala Lys Ile Glu Glu Ser 1475	1480	1485
Val Thr Lys Met Ile Met Arg Tyr Gly Pro Arg Leu Trp Lys Leu Arg 1490	1495	1500
Val Leu Gln Ala Glu Leu Lys Met Val Ile Arg Gln Ser Pro Gln Ser 505	1510	1515 1520
Pro Thr Gln Ala Val Arg Leu Cys Ile Ala Asn Asp Ser Gly Tyr Phe 1525	1530	1535
Leu Asp Ile Ser Met Tyr Thr Glu Gln Thr Glu Pro Glu Thr Gly Ile 1540	1545	1550
Ile Lys Phe Lys Ala Tyr Gly Glu Lys Gln Gly Ser Leu His Gly His 1555	1560	1565
Pro Ile Ser Thr Pro Tyr Met Thr Lys Asp Phe Leu Gln Gln Lys Arg 1570	1575	1580
Phe Gln Ala Gln Ser Asn Gly Thr Thr Tyr Val Tyr Asp Val Pro Asp 585	1590	1595 1600
Met Phe Arg Gln Met Thr Glu Arg His Trp Arg Glu Phe Ser Lys Ala 1605	1610	1615
Arg Pro Thr Val Asp Ile Arg Thr Pro Asp Lys Ile Leu Ile Glu Cys 1620	1625	1630
Lys Glu Leu Val Leu Glu Gly Asp Asn Leu Val Glu Met Gln Arg Leu 1635	1640	1645

- 16 -

Pro Gly Glu Asn Asn Cys Gly Met Val Ala Trp Arg Ile Val Leu Ala  
 1650 1655 1660  
 Thr Pro Glu Tyr Pro Asn Gly Arg Glu Ile Ile Val Ile Ala Asn Asp  
 665 1670 1675 1680  
 Leu Thr Tyr Leu Ile Gly Ser Phe Gly Ile Lys Glu Asp Val Leu Phe  
 1685 1690 1695  
 Ala Lys Ala Ser Gln Leu Ala Arg Gln Leu Lys Val Pro Arg Ile Tyr  
 1700 1705 1710  
 Ile Ser Val Asn Ser Gly Ala Arg Ile Gly Leu Ala Glu Glu Val Lys  
 1715 1720 1725  
 Ala Met Phe Lys Ile Ala Trp Glu Asp Pro Glu Glu Pro Asp Lys Gly  
 1730 1735 1740  
 Phe Lys Tyr Leu Tyr Leu Ser Thr Glu Asp Tyr Ala Gln Val Ala Asn  
 745 1750 1755 1760  
 Leu Asn Ser Val Arg Ala Ile Leu Ile Glu Asp Glu Gly Glu Gln Arg  
 1765 1770 1775  
 Tyr Lys Ile Thr Asp Ile Ile Gly Lys Asp Asp Gly Leu Gly Val Glu  
 1780 1785 1790  
 Asn Leu Arg Tyr Ala Gly Leu Ile Ala Gly Glu Thr Ser Gln Ala Tyr  
 1795 1800 1805  
 Glu Glu Ile Val Thr Ile Ala Met Val Thr Cys Arg Thr Ile Gly Ile  
 1810 1815 1820  
 Gly Ser Tyr Val Val Arg Leu Gly Gln Arg Val Ile Gln Ile Asp Asn  
 825 1830 1835 1840  
 Ser His Ile Ile Leu Thr Gly Tyr Ala Ala Leu Asn Lys Leu Leu Gly  
 1845 1850 1855  
 Arg Lys Val Tyr Ala Ser Asn Asn Gln Leu Gly Gly Thr Gln Ile Met  
 1860 1865 1870  
 Phe Asn Asn Gly Val Thr His Lys Thr Glu Ala Ile Asp Leu Asp Gly  
 1875 1880 1885  
 Val Tyr Thr Ile Leu Asp Trp Leu Ser Tyr Ile Pro Ala Tyr Ile Gly  
 1890 1895 1900  
 Cys Asp Leu Pro Ile Val Leu Pro Asn Asp Arg Ile Glu Arg Pro Val  
 905 1910 1915 1920  
 Asp Phe Met Pro Thr Lys Ser Pro Tyr Asp Pro Arg Trp Met Leu Gly  
 1925 1930 1935  
 Gly Arg Val Asn Pro Val Asn Ala Asn Asp Trp Glu Asn Gly Phe Phe  
 1940 1945 1950  
 Asp Arg Asp Ser Trp Ser Glu Ile Met Ala Ser Trp Ala Lys Thr Val  
 1955 1960 1965  
 Val Thr Gly Arg Ala Arg Leu Gly Gly Val Pro Val Gly Val Ile Ala  
 1970 1975 1980

- 17 -

Val Glu Thr Arg Thr Val Glu Val Glu Met Pro Ala Asp Pro Ala Asn  
 985 1990 1995 2000  
 Leu Asp Ser Glu Ala Lys Thr Leu Gln Gln Ala Gly Gln Val Trp Tyr  
 2005 2010 2015  
 Pro Asp Ser Ser Tyr Lys Thr Ala Gln Ala Ile Lys Asp Phe Gly Arg  
 2020 2025 2030  
 Glu Glu Leu Pro Leu Ile Val Phe Ala Asn Trp Arg Gly Phe Ser Gly  
 2035 2040 2045  
 Gly Met Lys Asp Met Tyr Glu Gln Ile Val Lys Phe Gly Ala Tyr Ile  
 2050 2055 2060  
 Val Asp Gly Leu Arg Glu Tyr Lys Lys Pro Val Leu Ile Tyr Leu Pro  
 065 2070 2075 2080  
 Pro Asn Ala Glu Leu Arg Gly Gly Ala Trp Ala Val Leu Asp Ser Leu  
 2085 2090 2095  
 Ile Asn Pro Arg Tyr Met Glu Thr Tyr Ala Asp Pro Glu Ala Arg Gly  
 2100 2105 2110  
 Gly Val Leu Glu Pro Glu Gly Ile Val Glu Ile Lys Tyr Lys Glu Lys  
 2115 2120 2125  
 Asp Leu Val Lys Thr Ile His Arg Leu Asp Pro Thr Thr Ile Ala Leu  
 2130 2135 2140  
 Lys Lys Glu Leu Asp Glu Ala Asn Ala Ser Gly Asp Lys Val Arg Ala  
 145 2150 2155 2160  
 Ala Gln Val Asp Glu Lys Ile Lys Ala Arg Ile Ala Val Leu Met His  
 2165 2170 2175  
 Val Tyr His Thr Val Ala Val His Phe Ala Asp Leu His Asp Thr Pro  
 2180 2185 2190  
 Glu Arg Met Leu Glu Lys Glu Cys Ile Ser Glu Ile Val Pro Trp Arg  
 2195 2200 2205  
 Asp Ser Arg Arg Trp Leu Tyr Trp Arg Leu Arg Arg Leu Leu Leu Glu  
 2210 2215 2220  
 Asp Ala Tyr Ile Lys Lys Ile Leu Arg Ala Gln Asp Asn Leu Ser Val  
 225 2230 2235 2240  
 Gly Gln Ala Lys Gln Met Leu Arg Arg Trp Leu Val Glu Glu Lys Gly  
 2245 2250 2255  
 Ala Thr Glu Ala Tyr Leu Trp Asp Lys Asn Glu Glu Met Val Ser Trp  
 2260 2265 2270  
 Tyr Glu Glu Gln Ile Asn Ala Glu Ser Ile Val Ser Arg Asn Val Asn  
 2275 2280 2285  
 Ser Val Arg Arg Asp Ala Ile Ile Ser Thr Ile Ser Lys Met Leu Glu  
 2290 2295 2300  
 Asp Cys Pro Asp Val Ala Leu Asp Ala Val Val Gly Leu Cys Gln Gly

305		2310		2315		2320									
Leu	Thr	Pro	Val	Asn	Arg	Gly	Val	Val	Val	Arg	Thr	Leu	Ala	Gln	Met
				2325					2330					2335	
Gln	Leu	Asn	Glu	Glu	Thr	Ser	Asn	Ser	Asn	Gln	Gly				
			2340					2345							

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
20. Juni 2002 (20.06.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/048321 A3**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C12N 9/00, 5/10,  
C07K 16/40, C07D 209/96

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme  
von US): **BAYER AKTIENGESELLSCHAFT** [DE/DE];  
51368 Leverkusen (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/14108

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:  
3. Dezember 2001 (03.12.2001)

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **FISCHER, Reiner**  
[DE/DE]; Nelly-Sachs-Str. 23, 40789 Monheim (DE).  
**FRANKEN, Eva-Maria** [DE/DE]; Sternstr. 21,  
42799 Leichlingen (DE). **NAUEN, Ralf** [DE/DE];  
Dechant-Miebach-Weg 43, 40764 Langenfeld (DE).  
**TEUSCHEL, Ute** [DE/DE]; Im Frohental 10, 51371  
Leverkusen (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

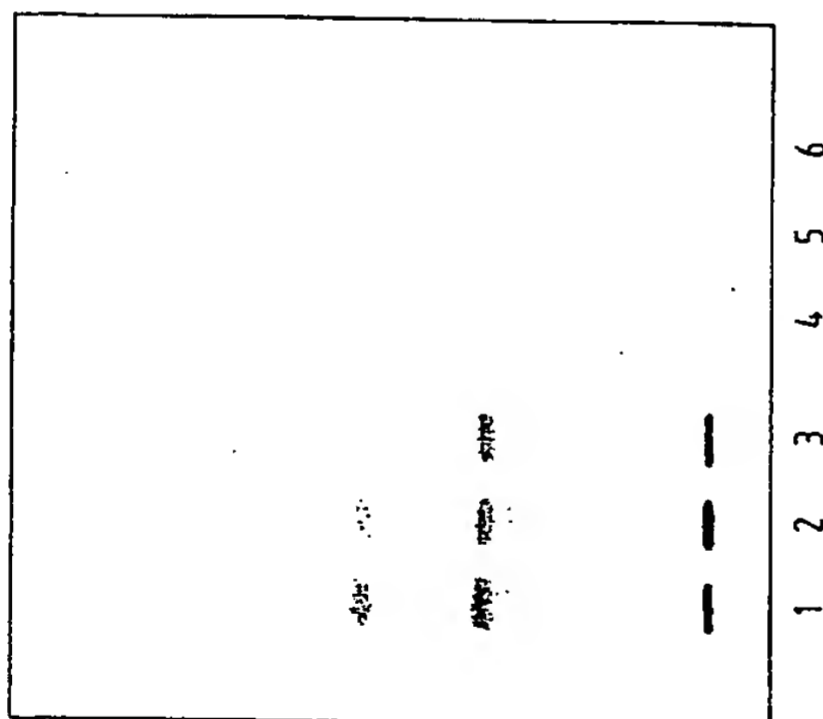
(30) Angaben zur Priorität:  
100 62 422.7 14. Dezember 2000 (14.12.2000) DE

(74) Gemeinsamer Vertreter: **BAYER AKTIENGE-  
SELLSCHAFT**; 51368 Leverkusen (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

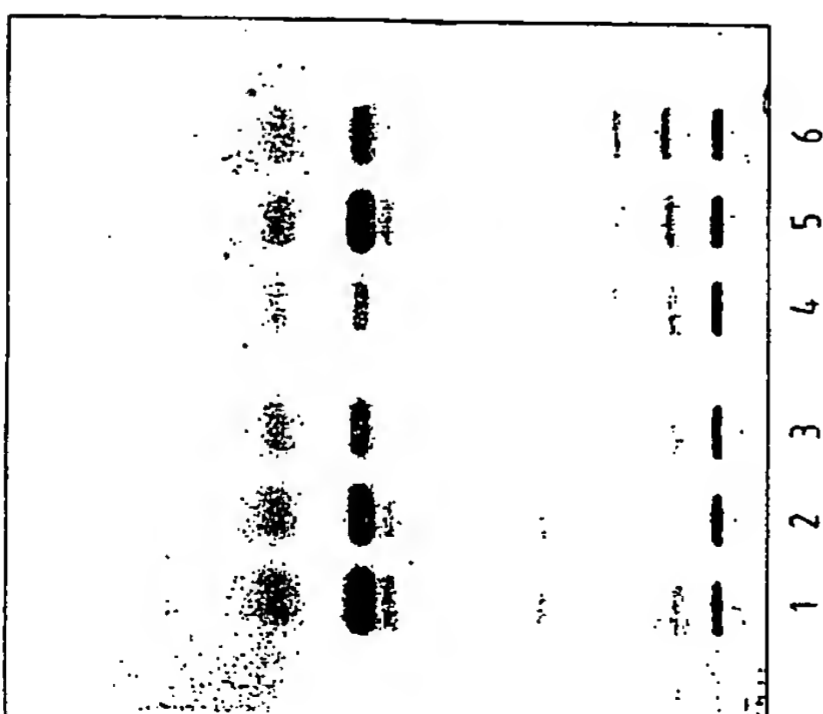
(54) Title: USE OF ACETYL-COA CARBOXYLASE FOR IDENTIFYING COMPOUNDS THAT HAVE AN INSECTICIDAL  
EFFECT

(54) Bezeichnung: VERWENDUNG VON ACETYL-COA CARBOXYLASE ZUM IDENTIFIZIEREN VON INSEKTIZID  
WIRKSAMEN VERBINDUNGEN



(57) Abstract: The invention relates to nucleic acids, which code for polypeptides from insects having the biological activity of acetyl-CoA carboxylases, to polypeptides coded thereby, and to their use for identifying novel compounds that have an insecticidal effect. The invention also relates to methods for discovering modulators of these polypeptides, and to the use of these compounds as inhibitors of the ACCase from insects.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Nukleinsäuren, die für Polypeptide aus Insekten mit der biologischen Aktivität von Acetyl-CoA Carboxylasen kodieren, die davon kodierten Polypeptide und deren Verwendung zum Identifizieren von neuen, insektizid wirksamen Verbindungen. Die Erfindung betrifft weiterhin Verfahren zum Auffinden von Modulatoren dieser Polypeptide sowie die Verwendung dieser Verbindungen als Inhibitoren der ACCase aus Insekten.



WO 02/048321 A3



(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),

OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen**

**Recherchenberichts:**

13. Februar 2003

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.*

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inte      nal Application No  
PCT/EP 01/14108

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7    C12N9/00    C12N5/10    C07K16/40    C07D209/96

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7    C12N    C07K    C07D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EMBL, EPO-Internal, BIOSIS, GENSEQ

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL 'Online! 28 March 2000 (2000-03-28) ADAMS, M.D. ET AL.: "Drosophila melanogaster genomic scaffold 142000013386047 section 4 of 52, complete sequence" Database accession no. AE003839 XP002201243 -& DATABASE TREMBL 'Online! 1 May 2000 (2000-05-01) ADAMS, M.D. ET AL.: "CG8723 protein" Database accession no. Q9V346 XP002201244	1-10
X	FR 2 784 859 A (BAYER AG) 28 April 2000 (2000-04-28) page 1, line 6-13 -/-	19,21-23



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*G\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

5 July 2002

Date of mailing of the international search report

18/07/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

ALCONADA RODRIG..., A

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No

PCT/EP 01/14108

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 36868 A (ERDELEN CHRISTOPH ;LIEB VOLKER (DE); SCHNEIDER UDO (DE); WIDDIG AR) 9 October 1997 (1997-10-09) page 45; table 1 page 94, line 1-6 ---	19,21-23
Y	US 6 153 374 A (VAHLENSIECK HANS-FRIEDRICH ET AL) 28 November 2000 (2000-11-28) column 5, line 43 -column 6, line 25 column 6, line 64 -column 7, line 27 ---	11-18
Y	POPHAM HOLLY J R ET AL: "Effect of a hypolipidemic agent on the growth and development of the southwestern corn borer, <i>Diatraea grandiosella</i> ." COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY C PHARMACOLOGY TOXICOLOGY & vol. 115, no. 3, 1996, pages 247-249, XP001074765 1996 ISSN: 0742-8413 cited in the application figure 1 ---	11-18
A	US 6 114 540 A (FOKAS DEMOSTHENES ET AL) 5 September 2000 (2000-09-05) column 2, line 1-18 column 15, line 12 -column 16, line 12 -----	21

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP01/14108

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2. ☒ Claims Nos.: 20 in full and 22, 23 in part  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:  
  
**see supplemental sheet**
  
3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of I.2

Claims: 20 (in full) and 22, 23 (in part

Claim 20 is missing.

The current Claims 22 and 23 relate to products characterized in each case by a desirable particularity or property, that is that they could be found by a method according to Claim 16 or 17. The claims therefore encompass all products that have this particularity or property, yet the application supports by the description (PCT Article 5) only a limited number of such products, etc. In the present case the claims lack the proper support and the application the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the the entire range of protection sought. Moreover, the claims also lack the clarity demanded (PCT Article 6) since they attempt to define the products in terms of the desired results. This defect too is such that it makes it impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Therefore, the search was directed to the parts of the claims that appear clear, supported or disclosed in the above sense, that is the parts concerning the dicarbonyl compound of the formula given in Example 4.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/14108

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2784859	A	28-04-2000	AU 5268099 A BR 9905110 A CN 1252220 A DE 19939395 A1 FR 2784859 A1 IT MI992188 A1 JP 2000128710 A NL 1013258 C2 NL 1013258 A1 TR 9902611 A2 ZA 9906662 A	04-05-2000 15-08-2000 10-05-2000 27-04-2000 28-04-2000 19-04-2001 09-05-2000 14-11-2000 26-04-2000 21-02-2001 23-10-2000
WO 9736868	A	09-10-1997	DE 19649665 A1 AU 725852 B2 AU 2290097 A BR 9708425 A CA 2250417 A1 CN 1215390 A WO 9736868 A1 EP 0891330 A1 JP 2000507564 T TR 9801990 T2 US 6140358 A US 2001004629 A1 US 6388123 B1	09-10-1997 19-10-2000 22-10-1997 03-08-1999 09-10-1997 28-04-1999 09-10-1997 20-01-1999 20-06-2000 21-06-2000 31-10-2000 21-06-2001 14-05-2002
US 6153374	A	28-11-2000	NONE	
US 6114540	A	05-09-2000	US 6358750 B1 AU 9307098 A CA 2302650 A1 EP 1125937 A2 EP 1015430 A1 WO 9912904 A1	19-03-2002 29-03-1999 18-03-1999 22-08-2001 05-07-2000 18-03-1999

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/14108

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N9/00 C12N5/10 C07K16/40 C07D209/96

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K C07D

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EMBL, EPO-Internal, BIOSIS, GENSEQ

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL 'Online! 28. März 2000 (2000-03-28) ADAMS, M.D. ET AL.: "Drosophila melanogaster genomic scaffold 142000013386047 section 4 of 52, complete sequence" Database accession no. AE003839 XP002201243 -& DATABASE TREMBL 'Online! 1. Mai 2000 (2000-05-01) ADAMS, M.D. ET AL.: "CG8723 protein" Database accession no. Q9V346 XP002201244 ---	1-10
X	FR 2 784 859 A (BAYER AG) 28. April 2000 (2000-04-28) Seite 1, Zeile 6-13 ---	19, 21-23



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- \*A\* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- \*E\* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- \*L\* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- \*O\* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- \*P\* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

\*T\* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

\*X\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

\*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

\*Z\* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

5. Juli 2002

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

18/07/2002

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

ALCONADA RODRIG..., A

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 36868 A (ERDELEN CHRISTOPH ;LIEB VOLKER (DE); SCHNEIDER UDO (DE); WIDDIG AR) 9. Oktober 1997 (1997-10-09) Seite 45; Tabelle 1 Seite 94, Zeile 1-6 ---	19,21-23
Y	US 6 153 374 A (VAHLENSIECK HANS-FRIEDRICH ET AL) 28. November 2000 (2000-11-28) Spalte 5, Zeile 43 -Spalte 6, Zeile 25 Spalte 6, Zeile 64 -Spalte 7, Zeile 27 ---	11-18
Y	POPHAM HOLLY J R ET AL: "Effect of a hypolipidemic agent on the growth and development of the southwestern corn borer, <i>Diatraea grandiosella</i> ." <del>COMPARATIVE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY C</del> <del>PHARMACOLOGY TOXICOLOGY &amp;</del> Bd. 115, Nr. 3, 1996, Seiten 247-249, XP001074765 1996 ISSN: 0742-8413 in der Anmeldung erwähnt Abbildung 1 ----	11-18
A	US 6 114 540 A (FOKAS DEMOSTHENES ET AL) 5. September 2000 (2000-09-05) Spalte 2, Zeile 1-18 Spalte 15, Zeile 12 -Spalte 16, Zeile 12 -----	21

**Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)**

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich \_\_\_\_\_
2. ☒ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_ *in full* 20 (vollständig) und 22,23 *in part* (teilweise)  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

**Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)**

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr. \_\_\_\_\_
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt: \_\_\_\_\_

**Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs**

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 20 (vollständig) und 22,23 (teilweise)

Patentanspruch 20 fehlt.

Die geltenden Patentansprüche 22 und 23 beziehen sich auf Produkte, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich, dass sie mittels eines Verfahrens gemäß Anspruch 16 oder 17 gefunden werden können. Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte, die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT nur für eine begrenzte Zahl solcher Produkte etc. liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, die Produkte über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die Dicarbonylverbindung mit der im Beispiel 4 angegebenen Formel.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

 Inter  
 des Aktenzeichen  
 PCT/EP 01/14108

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
FR 2784859	A	28-04-2000	AU 5268099 A	04-05-2000
			BR 9905110 A	15-08-2000
			CN 1252220 A	10-05-2000
			DE 19939395 A1	27-04-2000
			FR 2784859 A1	28-04-2000
			IT MI992188 A1	19-04-2001
			JP 2000128710 A	09-05-2000
			NL 1013258 C2	14-11-2000
			NL 1013258 A1	26-04-2000
			TR 9902611 A2	21-02-2001
			ZA 9906662 A	23-10-2000
WO 9736868	A	09-10-1997	DE 19649665 A1	09-10-1997
			AU 725852 B2	19-10-2000
			AU 2290097 A	22-10-1997
			BR 9708425 A	03-08-1999
			CA 2250417 A1	09-10-1997
			CN 1215390 A	28-04-1999
			WO 9736868 A1	09-10-1997
			EP 0891330 A1	20-01-1999
			JP 2000507564 T	20-06-2000
			TR 9801990 T2	21-06-2000
			US 6140358 A	31-10-2000
			US 2001004629 A1	21-06-2001
			US 6388123 B1	14-05-2002
US 6153374	A	28-11-2000	KEINE	
US 6114540	A	05-09-2000	US 6358750 B1	19-03-2002
			AU 9307098 A	29-03-1999
			CA 2302650 A1	18-03-1999
			EP 1125937 A2	22-08-2001
			EP 1015430 A1	05-07-2000
			WO 9912904 A1	18-03-1999